

# ロスモンドートムソン症候群原因遺伝子産物RecQL4 の機能の生化学的解析

|        |   |
|--------|---|
| 著者     | 熊田 裕司   |
| 学位授与機関 | Tohoku University   |
| 学位授与番号 | 400   |
| URL    | <a href="http://hdl.handle.net/10097/45997">http://hdl.handle.net/10097/45997</a> |

ロスモンドートムソン症候群原因遺伝子産物  
**RecQL4** の機能の生化学的解析

東北大学大学院薬学研究科  
生命薬学専攻

熊田 裕司

## 発表論文リスト

本学位論文は以下の原著論文を基礎としたものである。

1. Yuji Kumata, Shusuke Tada, Yumie Yamanada, Takashi Tsuyama, Takayuki Kobayashi,

Yu-Peng Dong, Kyoko Ikegami, Hiromu Murofushi, Masayuki Seki and Takemi Enomoto

Possible involvement of RecQL4 in the repair of double-strand DNA breaks in *Xenopus* egg extracts.

Biochimica et Biophysica Acta, in press.

## 略語表

本文中に用いた略語は以下の通りである。

ATM : ataxia telangiectasia mutated protein kinase

ATR: ATM- and Rad3 related protein kinase

ATP : adenosine-5'-triphosphoric acid

APH : aphidicolin

BLM : Bloom syndrome protein

bp : basis pairs

BS : Bloom syndrome

BSA : bovine serum albumin

CDI: cyclin-dependent kinase inhibitor

CDK: cyclin-dependent kinase

CPT : camptothecin

DNA-Pkcs: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit

DSB(s): DNA double strand break(s)

DTT : dithiothreitol

dTTP: deoxy thymine-5'-triphosphoric acid

dUTP: deoxy uridine-5'-triphosphoric acid

EB : extraction buffer

EDTA : ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid

e.r. : energy regenerator

EST : expressed sequence tag

FITC: fluorescein isothiocyanate

GFP : green fluorescent protein

GST : glutathion-S-transferase



h: human

HEPES : N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-ethane sulfonic acid

HR: homologous recombination

HU: hydroxy urea

IPTG : isopropyl-1-thio-  $\beta$  -D-galactoside

m: mouse

MBT: midblastula transition

Mcm : minichromosome maintenance

2-ME : 2-mercaptoethanol

MHSB : modified high salt barth

MMS: methyl methanesulfonate

NHEJ: non-homologous end joining

NLS : nuclear localization signal

4-NQO: 4-nitroquinoline-1-oxide

PBS : phosphate-buffered saline

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

Pol  $\alpha$  : DNA polymerase alpha

Pol  $\epsilon$  : DNA polymerase epsilon

RF-C : replication factor-C

RPA : replication protein A

RTS : Rothmund-Thomson syndrome

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SGS1: slow growth suppressor 1

SUMO-1: Small ubiquitin-related modifier-1

Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane

Top: topoisomerase

Tween 20 : polyoxyethylene (20) sorbitanmonolaurate

TLS: translesion synthesis

UV: ultraviolet

WRN : Werner syndrome protein

WS : Werner syndrome

x: *Xenopus laevis*

XP : xeroderma pigmentosum

# 目次

|      |   |    |
|------|---|----|
| 第1章  | 要旨  | 1  |
| 第2章  | 序論  | 5  |
| 第1節  | はじめに  | 5  |
| 第2節  | 細胞周期  | 5  |
| 第3節  | アフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞実験系                             | 8  |
| 第4節  | RecQ ヘリカーゼファミリー                                     | 10 |
| 第5節  | DNA 複製  | 16 |
| 第6節  | DNA 複製開始とライセンス化                                     | 17 |
| 第7節  | DNA 傷害  | 19 |
| 第8節  | DNA 修復機構  | 20 |
| 第9節  | チェックポイント機構  | 23 |
| 第10節 | 本研究の目的  | 31 |
| 第3章  | 結果  | 33 |
| 第1節  | <i>EcoRI</i> による DNA 二本鎖切断の誘発に応じた RecQL4 の挙動        | 33 |
| 第2節  | RPA 除去抽出液における RecQL4 の挙動                            | 36 |
| 第3節  | Rad51 のクロマチン結合の阻害による RecQL4 の挙動の変化                  | 38 |
| 第4節  | チェックポイント機構および DNA-PK の阻害による<br>RecQL4 の挙動の変化        | 41 |
| 第5節  | ChIP 法を用いたクロマチン上の<br>RecQL4、Ku70 および Rad51 の位置関係の解析 | 43 |
| 第6節  | RecQL4 免疫除去卵抽出液における $\gamma$ H2AX の挙動の変化            | 44 |
| 第7節  | aphidicolin (APH) による DNA 複製の障害と<br>RecQL4 の挙動の解析   | 47 |
| 第8節  | RecQL4 免疫除去卵抽出液における<br>DNA 複製再開後の DNA 複製速度の解析       | 49 |
| 第9節  | チェックポイント機構の阻害による<br>DNA 複製再開後の DNA 複製速度への影響         | 51 |
| 第10節 | RecQL4 免疫除去卵抽出液による Chk1 のリン酸化の変化                    | 52 |
| 第11節 | RecQL4 と DNA 複製開始点発火機構との関係                          | 53 |
| 第12節 | RecQL4 と DNA 複製装置維持機構との関係                           | 55 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 第4章 考察                     | 58 |
| DNA 二本鎖切断修復における RecQL4 の機能 | 58 |
| DNA 複製の障害に対する RecQL4 の機能   | 62 |
| 第5章 実験材料および方法              | 66 |
| 謝辞                         | 78 |
| 参考文献                       | 79 |

# 第 1 章 要旨

大腸菌 RecQ と相同性を有するタンパク質は、細菌からヒトまで多くの種で普遍的に保存されている。これらのタンパク質は RecQ ファミリーと総称されており、ゲノムの安定性に重要な役割を果たしていると考えられている。ヒトにおいては、現在までに *RECQL1*、*BLM*、*WRN*、*RECQL4*、*RECQL5* の少なくとも 5 種類の RecQ ファミリータンパク質遺伝子が単離されており、*BLM*、*WRN* はそれぞれ Bloom 症候群 (BS)、Werner 症候群 (WS) の原因遺伝子であることが明らかになっている。さらに近年、常染色体劣性遺伝病であり皮膚変性と白内障を伴う Rothmund-Thomson 症候群 (RTS) の一部について *RECQL4* の変異が原因であることが報告された。RecQ ファミリータンパク質は総じてゲノム安定性維持に中心的な役割を持つと考えられているが、*RecQL4* についても、DNA 複製の開始に必須な一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体 RPA のクロマチン結合に要求されること、DNA 傷害時に DNA 二本鎖切断 (DSB) に対する相同組み換え修復機構で機能する Rad51 と局在が一致することがこれまでに示されている。しかしながら、DNA 複製の開始、進行や DSB 修復における *RecQL4* の分子レベルの作用機序についてはほとんど報告されていない。

アフリカツメガエル (*Xenopus*) 卵抽出液無細胞実験系は初期胚で観察される細胞周期を試験管内で容易に再現することができる実験系であり、これを用いて DNA 複製時や DNA 傷害誘導時におけるタンパク質の挙動やクロマチンの動態などのダイナミックな変動を分子レベルから詳細に解析することが可能である。本研究では、*RECQL4* 遺伝子産物 (*RecQL4*) の機能を生化学的解析により理解するために、*Xenopus RecQL4* に対する特異的な抗体とこの無細胞実験系を用いて *RecQL4* の機能と動態の解析をおこなった。

## 1、DNA 複製の障害時における *RecQL4* の機能

細胞生物学的解析より、BS 患者細胞においては細胞周期の S 期が延長することが、WS

患者細胞においては DNA 複製開始点間距離が伸長することが知られている。さらに、BLM が DNA 複製フォークの安定化に関与しているという報告もある。そこで、同じ RecQ ファミリーに属する RecQL4 が DNA 複製の開始や進行に機能しているかについて検討した。まず、DNA ポリメラーゼの阻害剤であるアフィディコリンによって DNA 複製フォークの進行の障害を誘導した際の RecQL4 のクロマチン結合を観察した。その結果、RecQL4 はアフィディコリンの処理に応じてクロマチン画分に移行することが確認された。この RecQL4 のクロマチン結合は DNA 複製開始阻害タンパク質 *geminin* を添加すると消失し、また、チェックポイントの起点となる ATM/ATR を阻害する *caffeine* を添加することにより増加した。これらの結果より、ここで見られた RecQL4 のクロマチン結合は DNA 複製、特に複製開始点の活性化に依存していると考えられた。

そこで、DNA 鎖伸長反応が障害を受けた際に RecQL4 が何らかの機能を果たすものと考え、アフィディコリン処理により停止した DNA 複製の再開について RecQL4 免疫除去卵抽出液をもちいて検討した。その結果、RecQL4 非存在時に DNA 複製の再開に際して DNA 複製速度が亢進される現象が観察された。さらに、この亢進した DNA 複製速度は、*caffeine* の添加によりチェックポイント機構を阻害した条件下で同様の DNA 複製の再開を観察した際に見られる DNA 複製速度と同等であった。

以上の結果より、RecQL4 は DNA 複製チェックポイント機構の活性化に関与しているか、あるいは、DNA 複製チェックポイント機構が引き起こす未発火の複製開始点の抑制や複製フォーク上の DNA 複製装置の維持に寄与している、という可能性が考えられた。まず、RecQL4 の DNA 複製チェックポイント活性化への関与について検討するために、活性化の指標となる Chk1 のリン酸化を検出したが、RecQL4 の有無による顕著な変化は観察されなかった。次に、複製開始点の新たな活性化を抑制した条件下で DNA 複製を再開させ、DNA 複製活性を測定した。しかしながら、RecQL4 の有無による DNA 複製速度の顕著な違いは観察されなかったため、アフィディコリン存在下で活性化している複製開始点の数に著しい差はないと考えられた。

最後に、停止した複製フォーク上の DNA 複製装置の維持に関わる可能性を検討するため、MCM 複合体による DNA 複製フォークの巻き戻しを抑制した条件下でアフィディコリンによる DNA 複製阻害を解除した。この処理により DNA 複製は著しく抑制されたが、この条件下での DNA 複製活性の有意な増強が RecQL4 の免疫除去によって観察された。この増強は、DNA 複製フォークの進行に障害が生じた際に、MCM 複合体が過剰に DNA 複製フォークを巻き戻したために引き起こされたと推測された。したがって、DNA 複製フォークが何らかの障害に遭遇した際に、RecQL4 は MCM 複合体の機能を調節し、これにより正常な DNA 複製の再開のための DNA 複製装置の維持に寄与していることが示唆された。

## 2、DNA 二本鎖切断修復機構における RecQL4 の機能

これまでに、RecQ ファミリータンパク質の DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復への関与を示唆する報告が数多く見られる。そこで、卵抽出液中の精子核クロマチンに制限酵素 *EcoRI* によって DSB を誘導した場合に、RecQL4 がクロマチンに結合するかについての検討をおこなったところ、DSB の生成に依存して RecQL4 がクロマチン画分に蓄積した。この RecQL4 のクロマチン結合は geminin を添加しても抑制されなかったことから、DNA 複製に依存しないことが確認された。この条件下において DNA 修復の開始に関与するリン酸化型ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX) の形成や非相同 DNA 末端結合修復 (NHEJ) に関与する Ku70 の顕著なクロマチンへの移行が観察された。以上の結果より、RecQL4 が DNA 二本鎖切断修復機構に関与している可能性が考えられたため、*EcoRI* によって誘起される RecQL4 のクロマチン結合について詳細に検討した。

RPA を卵抽出液から除去したところ、Mre11、Ku70 のクロマチン結合には変化は見られなかったが、RecQL4、Rad51 のクロマチン結合は消失した。したがって、DSB に応じた RecQL4 のクロマチン結合は Rad51 と同様に RPA に依存することが示唆された。さらに、Rad51-DNA 複合体形成を抑制する hBRCA2 の BRC4 domain タンパク質を作製し、卵

抽出液に添加した条件下で RecQL4 のクロマチン結合を観察した。その結果、Rad51 のクロマチンへの結合は消失したが、RecQL4 のクロマチン結合には変化が観察されなかった。これより、RecQL4 のクロマチン結合は Rad51 の機能に依存していないことが示唆された。

次に、ATR/ATM の阻害剤である caffeine、または、ATM と DNA-Pkcs の阻害剤である wortmannin を卵抽出液に添加し、DSB に応じた RecQL4 のクロマチン結合について検討した。その結果、RecQL4 のクロマチン結合はこれらの阻害剤の処理により減少した。これより、DSB によって誘発される RecQL4 のクロマチン結合は ATM の活性に依存することが示唆された。さらに、RecQL4 のクロマチン結合への影響が caffeine よりも wortmannin の方が顕著であることから、RecQL4 は DSB 修復過程において DNA-Pkcs の下流で機能している可能性が示唆された。

最後に、*EcoRI* の添加に応じて引き起こされる RecQL4 のクロマチン結合の意義を検討するために、DSB に応じてクロマチン上で生成するリン酸化型ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX) の減少を指標として、*EcoRI* によって生成した DSB の修復について検討した。その結果、RecQL4 免疫除去卵抽出液をもちいた場合に  $\gamma$ H2AX の減少の顕著な遅れが観察された。したがって、RecQL4 が DSB の修復を促進する機能を有することが示唆された。一方、 $\gamma$ H2AX の減少の遅れは DSB 修復の初期段階において顕著に観察されたのに対して、RecQL4 のクロマチンへの移行はより後期の段階で顕著に観察された。以上の結果は、RecQL4 が DSB 修復機構、とくに NHEJ において機能することを示唆するものであると同時に、RecQL4 が複数の修復経路にまたがって DSB 修復に関与する可能性を提示していると考えられる。



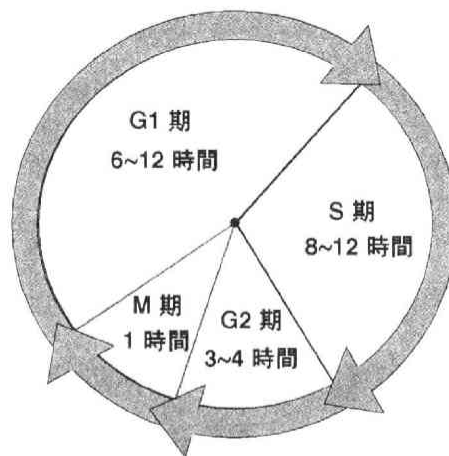
## 第2章 序論

### 第1節 はじめに

1953 年に Watson、Crick による二重らせん構造が提唱されてから 50 年、分子生物学の進歩は目覚ましく、それまでに確立された様々な学問の進展に大きく貢献してきた。しかし、このような状況でも DNA 二重らせん構造の維持や安定化の実に巧妙なメカニズムに関しては、まだ一握の現象を解明しているにすぎないのが現状であろう。

### 第2節 細胞周期

細胞は分裂によって増殖するが、細胞分裂そのものにかかる時間は哺乳類動物細胞で 1 時間弱である。しかし、娘細胞に伝達する遺伝情報を正確に複製するために、細胞はその何倍もの長い準備期間を費やしている。細胞が分裂する時期を M 期 (mitosis) と呼び、遺伝情報を娘細胞に伝えるために複製により DNA を倍加する時期を S 期 (DNA synthesis) と呼ぶ。大腸菌などの原核生物や真核生物の発生のごく初期には、この 2 つの時期だけが繰り返される細胞周期が観察される。ところが、真核生物の場合には、上記の初期発生段階の細胞分裂が一定回数にわたって繰り返された後、見かけ上の変化が乏しい時期が S 期と M 期の前に出現する。それらは G1 (gap1)、G2 (gap2) 期と呼ばれ、それぞれ S 期や M 期より長い時間を細胞周期の中で占めている。いったん増殖を始めると細胞は  $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M \rightarrow G1 \rightarrow \dots$  という順序で規則正しく進行していく (Fig.1)。



**Fig.1 真核生物における細胞周期**

細胞周期は  $G1 \rightarrow S \rightarrow M \rightarrow G1$  と順序よく進行する。M 期は形態上の変化が大きく、その時期は形態上の変化がほとんど無いことから、G1 期から G2 期までは間期 (interphase) と呼ばれている。

細胞周期の過程でもっとも大切な仕事は、DNA を正確に複製して均等に娘細胞に分配することである。これらを誤りなく遂行するため、2 種類の重要な調節機構が細胞内に存在する。1 つめは DNA 複製ライセンス機構と呼ばれる。DNA を複製する反応はゲノム上の全ての領域について 1 回の細胞周期で 1 回だけ起きることが重要であり、2 回以上複製した領域または複製しない領域がある場合には、娘細胞に正確なコピーを分配できないだけでなく、染色体構造に異常をもたらす可能性もある。このように DNA 複製が一回の細胞周期で一度だけ正確に起こるように制御する DNA 複製ライセンス因子が 1988 年に Blow と Laskey により仮説として提唱された (Blow and Laskey, 1988)。現在では、Mcm (mini-chromosome maintenance) タンパク質複合体が DNA 複製ライセンス因子の実体であることが明確に示されている。

二つめは、正確な複製と均等な分配を妨げる異常事態が起こったときに、異常を検出して修復機構に知らせ、修復されている間は細胞周期を停止させて修復のための時間稼ぎをするという優れた仕組みであり、チェックポイント機構と呼ばれている。チェックポイント機構は Hartwell と Weinert により最初に提唱され、現在では DNA 複製の進行、中心体の倍加と移動、紡錘体の形成、染色体凝集と分配など、細胞周期の様々な段階で働いて

いることが知られている。

細胞周期の正確な進行やチェックポイント機構による停止は cyclin と呼ばれるタンパク質によって厳密に制御されている。cyclin は細胞周期にともなってその量が周期的に変動する特徴から名付けられた。このタンパク質は cyclin 依存性タンパク質リン酸化酵素 (cyclin-dependent kinase: CDK) との結合ドメインである cyclin ボックスを持つ。同様の構造を持つタンパク質は現在までに 14 種類が知られており、cyclin ファミリーを形成している。それぞれの cyclin は様々な CDK をパートナーとして cyclin-CDK 複合体を形成し、CDK の調節サブユニットとしてタンパク質リン酸化酵素活性の亢進に携わっている。現在までに細胞周期の各段階で機能する何種類かの cyclin-CDK 複合体が明らかにされており、G1 期では cyclin D-Cdk4/6 (Sherr and Roberts, 1999)、S 期の開始では cyclin E-Cdk2 (Winston et al., 1999)、S 期では cyclin A-Cdk2、M 期では cyclin A-Cdc2 および cyclin B-Cdc2 がそれぞれの標的タンパク質をリン酸化する (Pines, 1999) (Table 1)。cyclin-CDK 複合体を細胞周期の進行に必要なアクセルにたとえるなら、ブレーキとなるタンパク質は CKI (cyclin-dependent kinase inhibitor) である (Nakayama, 1998; Sherr and Roberts, 1995)。CKI は cyclin-CDK と結合することで CDK 活性を阻害することが知られている。細胞周期の進行に際して、いくつかの cyclin-CDK 複合体とその活性を制御する CKI が協調的に制御されることにより細胞周期の進行が厳密に制御され、正確な DNA の倍加や分配が確実に起こるようになっている。

| Cdk    | 結合する cyclin | 機能             |
|--------|-------------|----------------|
| Cdk4/6 | cyclin D    | G1 期進行         |
| Cdk2   | cyclin E/A  | G1/S 期遷移・S 期進行 |
| Cdc2   | cyclin A/B  | M 期開始・進行       |

Table 1 主要な Cdk と細胞周期における機能

細胞周期の各時期でそれぞれ異なる cyclin-Cdk 複合体が働くことが知られている。

### 第3節 アフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞実験系

#### アフリカツメガエル初期胚の細胞周期

アフリカツメガエルの卵が受精後におこなう初期の細胞周期はいくつかの点で体細胞の細胞周期と異なることが知られている。アフリカツメガエルの卵は 20°C くらいであれば、受精の約 100 分後に第一回目の分裂をおこなう。この後は、ほぼ 35 分ごとに 11 回の分裂を繰り返す。このとき、分裂 (M 期) に要する時間は 3 分前後である。この初期胚の細胞周期は体細胞の細胞周期が 20-30 時間かかることを考えると驚異的なスピードである。このようにしてアフリカツメガエル卵発生初期の 12 回の細胞周期は、ほぼ 8 時間で終了する。13 回目の細胞周期では分裂速度が急激に低下し、体細胞の細胞周期も始まる (Fig. 2)。こうして初期胚の細胞分裂周期は通常の体細胞の分裂周期へと移行する。この時期が中期胚胞期と呼ばれる時期に当たるため、ここで起こるいくつかの変化を総称して中期胚胞の切り替え (midblastula transition, MBT) という。

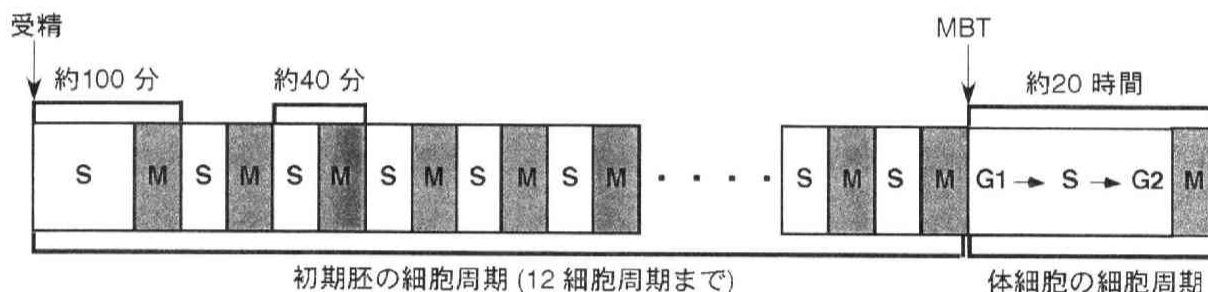


Fig.2 アフリカツメガエル初期胚の細胞周期

アフリカツメガエルは受精の約 100 分後に第一回目の分裂をおこない、その後、ほぼ 35 分ごとに 11 回の分裂を繰り返す。アフリカツメガエルの 12 回の細胞周期は、ほぼ 8 時間で終了する。そして、13 回目以降、分裂速度が低下し、G1 期と G2 期が観察される体細胞の細胞周期へと移行する。この時期を MBT と呼ぶ。

#### アフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞実験系

1983 年に Masui らにより開発されたアフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞実験系は細胞周期を研究する上で非常に優れた実験系である。卵抽出液に核膜を除いた精子核 DNA を加えるとクロマチンの脱凝集、核膜の形成、DNA 複製の開始および進行、染色体

の凝集が起こる (Fig.3)。この一連の変化はアフリカツメガエルの初期胚で観察される細胞周期と類似している。

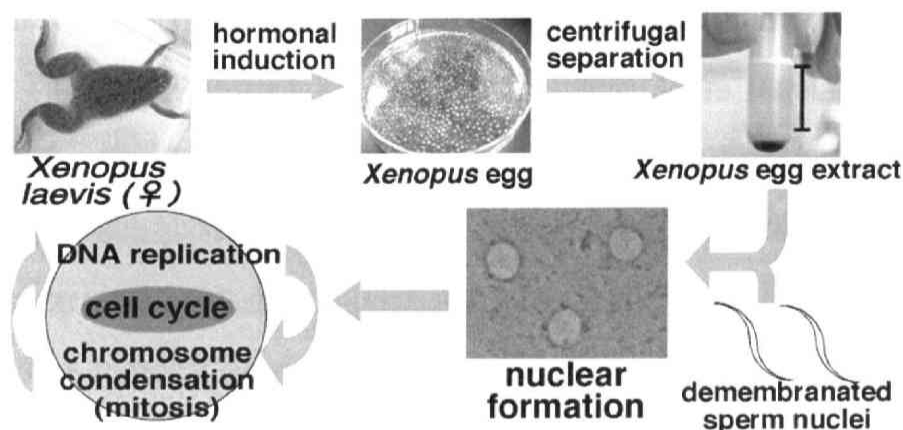


Fig.3 アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系

アフリカツメガエルの卵を遠心破碎して得られた抽出液に、核膜を除いた sperm DNA を添加することにより、試験管内で容易に細胞周期を再現することが可能である。

また、体細胞における細胞周期の進行には遺伝子の転写が必要であるが、卵には細胞周期を進行させるために必要な多くのタンパク質やメッセンジャーRNA が蓄積されており、転写はほとんどおこなわれていない。未受精卵は自発的に M 期の metaphase と anaphase の間に停止しており、人工的に細胞周期を進行させることもできるため、細胞周期特異的な (M 期と間期) 抽出液の調製が可能である。また、量的にも確保しやすく、タンパク質分解酵素がさほど活発ではないので生化学的な実験が容易である。これらの理由から、アフリカツメガエル卵抽出液を用いることで出芽酵母を中心とした遺伝学的な解析とは違う視点を与える独自で有用な実験系を構築することが可能であり、細胞周期の研究の発展に重要な役割を果たしている。

卵抽出液を用いた実験系では、特異的な抗体を用いた様々な生化学的解析が可能である。卵抽出液を用いた生化学的解析でもっともよく用いられる手法は、免疫除去 (immuno-depletion) である。免疫除去とは特異的な抗体を用いて卵抽出液から抗原タンパク質を枯渇 (depletion) させることによりそのタンパク質の機能を探る手法であり、細胞レベルの遺伝子破壊に類似しているが、遺伝子破壊により細胞致死になるようなタンパク質でも容

易に解析することができる。また、様々なタンパク質の核内への局在の変化は間接蛍光抗体法をもちいて検出することが可能であり、さらに、クロマチン画分の単離が容易なため、ウェスタンブロット法によりタンパク質のクロマチン結合を詳細に解析することもできる。前述の通り卵抽出液は自発的に同調しているため、以上の手法を用いて目的タンパク質の機能に関する時間的空間的な生化学的解析が可能である。

実際に細胞周期に関する多くの研究にアフリカツメガエルの卵抽出液が用いられ、多大な成果を上げている。細胞周期において中心的な役割を果たす cyclin-CDK はアフリカツメガエルの受精卵の成熟過程に必須な MPF (maturation promoting factor) として最初に発見されている (Masui and Markert, 1971)。また、DNA 複製ライセンス化因子についてもアフリカツメガエル卵抽出液をもちいた実験により、Mcm タンパク質複合体という実体が明らかになった (Kubota et al., 1997)。近年では、染色体の凝集に関与することが知られている condensin がアフリカツメガエル卵抽出液より単離され、その生化学的な機能が短期間で明らかにされている (Kimura et al., 1998; Kimura and Hirano, 1997; Kimura et al., 1999)。このようにアフリカツメガエル卵抽出液を用いた実験が細胞周期の研究の進展に寄与した功績は非常に大きい。

## 第4節 RecQ ヘリカーゼファミリー

DNA ヘリカーゼは、DNA の複製、修復、組み換え、転写の際に ATP の加水分解で生じるエネルギーを利用して、一本鎖 DNA 上を一方の方向に移動することにより、その DNA に結合した相補的 DNA (あるいは RNA) をほどく酵素の総称である。

細胞内では、複製、転写、組み換え、修復、翻訳などに際して二重らせんをほどく必要は間断なく発生するが、これらの需要に少数の汎用性ヘリカーゼで対応することは不可能であり、実際には進化の過程でこの複雑な素過程を効果よく進行させるためのスペシャリストの DNA ヘリカーゼが個々の任務を担当することになったようである。事実、各種生

物のゲノムプロジェクトの成果から、原核生物、真核生物を問わず、ゲノムの全遺伝子の約1%がDNAヘリカーゼをコードすることが予想されている。

DNAヘリカーゼ内のアミノ酸配列の特徴としては、ATP結合の基本モチーフであるWalkerモチーフのAモチーフGly-Lys-(Ser/Thr)とBモチーフAsp-Glu-X-Xを基本に、その他数種のモチーフが知られ、それらのモチーフ間の類似性から、DNAヘリカーゼはいくつかの亜群に分類される。タンパク質の会合状態としてはPcrAヘリカーゼなどの単量体、Repヘリカーゼなどの二量体、そして、MCMヘリカーゼやBLMヘリカーゼなどの六量体を中心としたオリゴマーなどがある。

近年、このDNAヘリカーゼをコードしている遺伝子の変異によって引き起こされる多くの遺伝病が明らかにされてきている。なかでも大腸菌のRecQヘリカーゼと高い相同性を有するBLM、WRN、RecQL4ヘリカーゼは、それぞれBloom症候群、Werner症候群、Rothmund-Thomson症候群の原因遺伝子産物である事が明らかになっている。これらの遺伝性疾患では、高発がん性や若年性老化症状を示し、これらの患者細胞ではそれぞれの疾患に特有の染色体構造の異常が見つかっている。このことからRecQヘリカーゼは『ゲノムの安定維持機構』に関わり、その欠損によりゲノムの不安定化、ひいては、がん化や老化が促進されると考えられている。

#### RecQL1 (DNA-dependent ATPase Q1/DNA helicase Q1)

RecQL1は、色素性乾皮症XP-C群の細胞においてFPLC MonoQカラムでの溶出塩濃度が正常細胞のそれと異なる3'-5'DNAヘリカーゼ(DNA helicase Q1)として精製された(Yanagisawa et al., 1992)。そのアミノ酸部分配列を基にヒトDNA helicase Q1のcDNAが単離されたが、これにより予想されたDNA helicase Q1の構造は大腸菌*recQ*遺伝子産物と高い相同性を示すものであった。ここで単離されたRecQL1cDNAは真核細胞で初めて確認されたRecQファミリータンパク質遺伝子となった(Seki et al., 1994; Puranam et al., 1994)。RecQL1のmRNAは、ほとんどすべてのヒト臓器で高い発現が認められている。一方、



マウスではヒトと異なり胸腺と精巣で顕著な発現が見られるが、他の臓器での発現は低い (Wang et al., 1998)。現在までに、当研究室において RecQL1 の NLS 配列、その核移行に関わる Qip1 タンパク質との相互作用、またマウスにおける splicing variant の存在を報告してきた (Seki et al., 1997; Wang et al., 1998)。

これまで RecQL1 とヒト遺伝病との関連は報告されていない。当研究室において、ニワトリ DT40 細胞 *BLM*<sup>-/-</sup>/*RECQL1*<sup>-/-</sup> 二重変異株の解析により、RecQL1 に BLM の機能を補う役割が見いだされているが、詳細な機能については不明な点が多い (Wang et al., 2003)。

## BLM (RecQL2)

Bloom 症候群 (BS) は、発育不全、免疫不全、不妊、種々の悪性腫瘍の若年での発生などの症状を呈する常染色体劣性の遺伝病で、患者由来の細胞では sister chromatid exchange (SCE) が高頻度に観察され、正常の個体では生殖細胞でしか起こらないはずの相同染色体間の組換えが体細胞レベルで確認されている (German, 1993)。また、DNA 傷害を誘起するアルキル化剤に対する感受性や DNA 複製時における DNA 鎖の伸長速度の遅延が観察されている (Hand and German, 1975)。この BS の原因遺伝子 *BLM* は 1995 年にクローニングされ、RecQ ファミリータンパク質をコードしていることが示された (Ellis et al., 1995)。

BS 原因遺伝子産物 (BLM) と相互作用するタンパク質としては I 型トポイソメラーゼの Top3α (Wu et al., 2000) や p53 (Wang et al., 2001)、MLH1 などが報告されている。MLH1 は mismatch repair や homologous recombination repair (HRR) に必要なタンパク質であるが、BLM は MLH1 と相互作用して HRR に働くものと考えられている (Langland, G. et al., 2001; Pedrazzi, G. et al., 2001)。真核生物における DNA 組換え酵素、Rad51 は DNA 傷害に応じて RPA などとともに focus を形成することが観察されているが (Kharbanda et al., 1998)、BLM、WRN も同様の局在を示すことが報告されており (Bischof et al., 2001; Sakamoto et al., 2001)、ここからも HRR への BLM の関与が示唆される。

また、BLM がホリデイジャンクションに結合し ATP 依存的に branch migration を促進



することが明らかとなり、複製フォークの安定化に関わっていることが示唆された (Karow et al., 2000)。これより、BLM を始めとする RecQ タンパク質ファミリーはこのような DNA 複製停止からの回復において機能していると考えられている。

さらに、家族性乳癌の原因遺伝子で癌抑制遺伝子の BRCA1 を中心とするタンパク質複合体 BASC (BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex) がゲノム安定性維持に重要な役割を果たすと考えられているが、多くの DNA 複製、修復、チェックポイントに関わるタンパク質群 (MSH2, MSH6, MLH1, ATM, Rad50-Mre11-Nbs1 complex, RF-C p40, p37) と共に BLM もその構成因子のひとつであることが報告されている (Wang et al., 2000)。最近、BLM と Top3 $\alpha$ が協調して DNA 複製の終了時に形成されるカテナンの解消に関与していることが示唆された (Seki et al., 2006)。

#### WRN (RecQL3)

Werner 症候群 (WS) は、代表的な遺伝的早期老化症候群 (早老症) のひとつであり、若年期から壮年期にかけて種々の老化関連症状を発症する常染色体劣性遺伝病である。主な臨床症状は、早期白髪、白内障、発育不全、皮膚硬化、糖尿病、動脈硬化、肉腫系がんなどがあげられる。細胞生物学的特徴としては分裂寿命の短縮、テロメア長の異常、ゲノム不安定性などが挙げられる。種々の DNA 傷害を誘起する処理に対しては、UV や放射線には感受性を示さないが、カンプトテシンや 4NQO などへの感受性が高いことが報告されている (Martin et al., 1977; Schulz et al., 1996; Fujiwara, 1977)。これまでに、WS 原因遺伝子産物 WRN には DNA 依存性 ATPase 活性、3'-5' DNA ヘリカーゼ活性に加えて、3'-5' エキソヌクレアーゼ活性が存在することが報告されている (Gray et al., 1997; Huang et al., 1998)。また、WRN は PCNA、RPA、Ku 複合体、DNA-PKcs、DNA topoisomerase I、p53、DNA polymerase  $\delta$ 、FEN-1 などのタンパク質と相互作用していることが明らかとなっている (Shen et al., 2001; Brosh Jr. et al., 2002; Yannone et al., 2001; Karmakar et al., 2002; Brosh Jr. et al., 2001)。

## RecQL4

Rothmund-Thomson 症候群 (RTS) は、1869 年、ドイツの眼科医 August Rothmund によってまれな皮膚変性を伴った白内障として報告された常染色体劣性遺伝病であり、現在までに 200 以上の症例が報告されている。RTS は WS に類似した白内障、発育不全など早期老化症状を示すが、WS が 10~20 代で発症するのに対し、RTS は生後 1 年以内に発症する場合がほとんどである (Lindor et al., 2000)。また、BS で見られる日光過敏症、高発がん性などの臨床症状も示す。RTS 患者由来の線維芽細胞における紫外線照射後の DNA 修復能は正常なケースが多いが、異常を認める報告もある。また  $\gamma$ 線照射後の DNA 修復能に関しても同様で、正常と異常の両方の結果が報告されている。線維芽細胞や末梢血リンパ球の核型はほとんどの場合正常であるが、2、8 番染色体のトリソミーを含む核型の異常も報告されている。一方、細胞レベルでは *RECQL4* の変異をもつ患者由来の線維芽細胞や末梢血リンパ球において、トリソミーや同腕染色体 (isochromosome) がみとめられ、染色体不安定化が報告されている (Shimamoto, 2002)。

RECQL4 は 1998 年にヒト expressed sequence tag (EST) データベース上で見いだされた部分配列をもとにクローニングされたもので、8 番染色体長腕 8q24.3 に位置し、全長 1208 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている。その遺伝子産物は、大腸菌 RecQ との相同性から 4 番目に発見されたヒトにおける RecQ 相同タンパク質となった (Kitao et al., 1998)。RecQL4 は BLM や WRN と同様にヘリカーゼモチーフの域外に長い N 末端と C 末端配列を持つタイプの RecQ 相同タンパク質をコードしていたことから、染色体不安定性を特徴とする既存の遺伝病との関係が調べられ、RTS 患者の約半数で RecQL4 に変異があることが確認された (Kitao et al., 1999)。

また、RecQL4 の mRNA は胸腺と精巣で発現が著しく高いことが報告されている (Kitao et al., 1998)。RecQL4 は核タンパク質であり、核質及び核小体に局在することも見出されている。さらに、抗がん剤の一つで DNA 傷害を引き起こすアドリマイシンで細胞を処理した場合に核内でドット状に局在することが観察されており、何らかの DNA 傷害を認

識して、その修復に機能していることが示唆された。一方、カンプトテシン、エトポシド、ブレオマイシンなどで細胞を処理したときには RecQL4 の局在に変化が見られなかった。そのため、RecQL4 は DNA 傷害に対して何らかの特異性を持ち、染色体安定化において WRN とは異なった役割を果たすことが示唆されている。

Table2 に 3 つの症候群の臨床症状をまとめた。

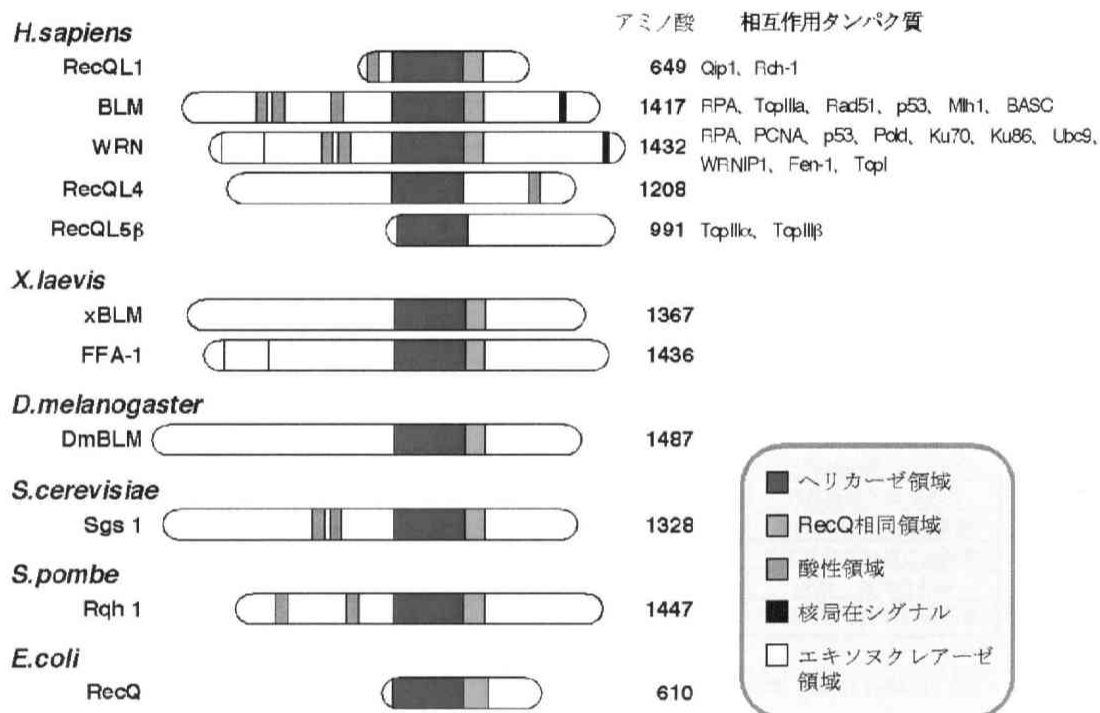
| 臨床症状        | BS | WS  | RTS |
|-------------|----|-----|-----|
| 低身長         | +  | +   | +   |
| 白内障         | +  | +   | +   |
| 白髪、脱毛症      | -  | +   | +   |
| 日光過敏症       | +  | -   | +   |
| 毛細血管拡張症     | +  | -   | +   |
| 色素沈着        | +  | +   | +   |
| 糖尿病         | 8% | 44% | -   |
| 免疫低下        | +  | -   | ?   |
| 性機能不全       | +  | +   | +   |
| 知能障害        | -  | -   | -   |
| 高頻度の異所性がん   | +  | +   | +   |
| 各種薬剤の細胞毒性   | +  | +   | +   |
| 患者細胞の染色体異常  | +  | +   | +   |
| 高頻度の姉妹染色体交換 | +  | -   | -   |
| 染色体欠失、転座    | -  | +   | -   |
| 転座染色体モザイク現象 | -  | -   | +   |

Table2 RecQ ファミリー遺伝子疾患における臨床症状

## RecQL5

*RECQL5* は *RECQL4* と同時に報告された遺伝子であり、その遺伝子座は 17q25.2-3 である。*RECQL5* 遺伝子産物 RecQL5 は RecQL1 に似てヘリカーゼ領域外の N 末側が短いタイプの RecQ ヘリカーゼであるが、ノーザンブロット解析により BLM、WRN、RecQL4 と同様に脾臓、精巣で発現が高いことが明らかになっている (Kitao et al.,1998)。*RecQL5* は alternative splicing により、410 アミノ酸からなる RecQL5 $\alpha$ 、長い C 末を待ち 991 アミノ酸からなる RecQL5 $\beta$ 、435 アミノ酸からなる RecQL5 $\gamma$ の少なくとも 3 種のアイソマーが存在している。GFP 融合タンパク質を用いて細胞内の局在が調べられており、RecQL5 $\alpha$  は核内に存在しないが、RecQL5 $\beta$ は核内に存在していることが示された (Sekelsky et al., 1999)。また、RecQL5 $\alpha$ が DNA トポイソメラーゼ III $\alpha$ と $\beta$ の両方と相互作用することが認

められており、細胞内で両者が共局在していることも報告されている (Shimamoto et al., 2000)。最近、当研究室で解析されたニワトリ DT40 細胞 *BLM<sup>-/-</sup>/RECQL5<sup>-/-</sup>* 二重変異株の解析より、RecQL1 と同様に RecQL5 にも BLM の機能を補う役割が見出されている (Wang et al., 2003)。



**Fig.4 RecQ ファミリーDNA ヘリカーゼ**

ヒト、アフリカツメガエル、ショウジョウバエ、出芽酵母、分裂酵母、大腸菌における RecQ ファミリーDNA ヘリカーゼを模式的に示した。また、最も良く解析の進んでいるヒト RecQ ファミリーDNA ヘリカーゼについては相互作用しているタンパク質を示した。

## 第5節 DNA複製

真核生物では細胞分裂が繰り返され細胞が増殖していく。この際、娘細胞に正確な遺伝情報を伝えるため、S 期において DNA の半保存的な合成が行われる。

DNA 複製の進行において、まず、Pol α-primase complex が RNA プライマーを含む 100-

200 ヌクレオチドの短鎖 DNA を合成する。次に短鎖 DNA の 3'末端部位に Pol  $\delta$  が RFC と PCNA の介在により結合し、ラギング鎖の合成を行う。また、Pol  $\delta$  は Pol  $\epsilon$  と協調してリーディング鎖の合成を行うとも考えられている (Fukui et al., 2004)。DNA の伸長合成が隣接する RNA プライマーに達した後、その RNA プライマーは RNase H および FEN-1 によって取り除かれ、その間隙を pol  $\delta$  が埋める。さらに、DNA ligase I が隣接する DNA との間を連結して DNA 複製は終了する (Waga and Stillman, 1998) (Fig.5)。

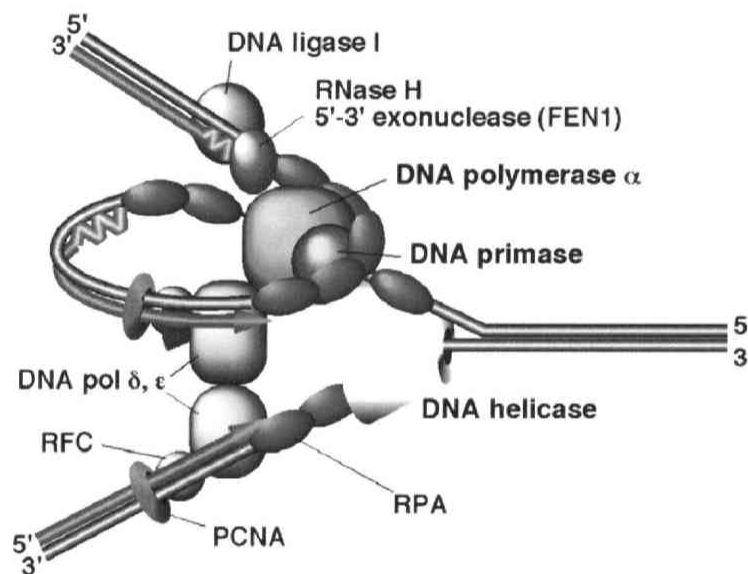


Fig.5 DNA 複製フォークモデル

## 第6節 DNA 複製開始とライセンス化

DNA 複製機構は、出芽酵母、simian virus (SV) 40 を用いた無細胞 DNA 複製系、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた実験系によりその基本骨格が明らかになった。そのなかで、DNA 複製の開始は出芽酵母の自律複製配列に特異的に結合するタンパク質複合体の発見により大きく発展した。この複合体は 6 つのサブユニット (Orc1~Orc6) から構成されており、ORC (origin recognition complex) と命名された。このタンパク質複合体の機能の解析はアフリカツメガエル卵抽出液を用いておこなわれ、ORC を免疫除去した抽出液中で

は、Cdc6 と Mcm タンパク質のクロマチンへの結合が阻害された。一方、Cdc6 を免疫除去すると、ORC の結合は阻害されないが、MCM 複合体の結合は阻害された。したがって、Cdc6 のクロマチンへの結合には ORC が必要であり、MCM 複合体の結合には ORC と Cdc6 の両方が必要であることが明らかとなった (Coleman et al., 1996)。

MCM 複合体はライセンス因子の 1 つと考えられている。Mcm タンパク質は真核生物に広く存在し、Mcm 2〜7 の 6 種のタンパク質からなる一群のファミリーであることが明らかとなっている (Thommes et al., 1997)。

また、もう 1 つのライセンス因子である RLF-B については完全精製がおこなわれ、分裂酵母 Cdt1 の相同タンパク質であり、DNA 複製の開始に関与していることが示された (Tada et al., 1999; Tada et al., 2001)。DNA 複製の開始における Cdt1 の役割は、Cdc6 と共に MCM 複合体をクロマチンへ結合させることである (Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000)。DNA 複製の内因性阻害タンパク質である geminin は APC (anaphase promoting complex) を経由したユビキチン化経路により M 期後期に分解される 25kDa のタンパク質であり (McGarry and Kirschner, 1998)、Cdt1 と結合しその活性を阻害することが示されている (Fig.6)。この geminin の細胞周期における挙動は、DNA 複製ライセンス化反応と密接な関係があると考えられている。APC により geminin が分解されると、geminin と結合していた Cdt1 が活性化し、MCM 複合体をクロマチン上へ結合させる。DNA 複製開始以後は geminin タンパク質の合成が盛んになり Cdt1 の活性が阻害されることで MCM 複合体のクロマチンへの結合が抑制されるものと考えられる (Wohlschlegel et al., 2000)。

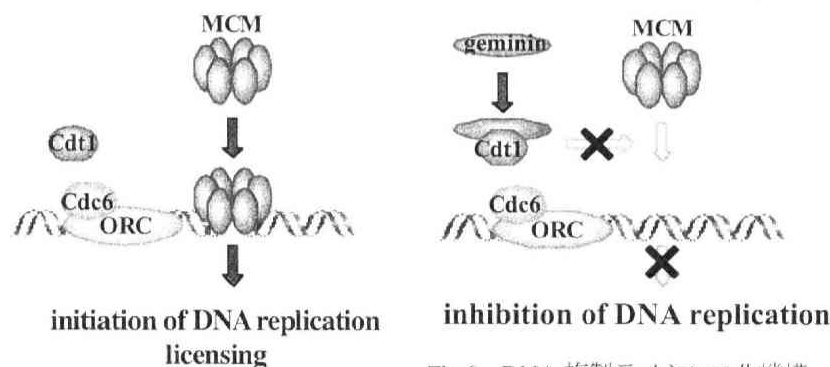


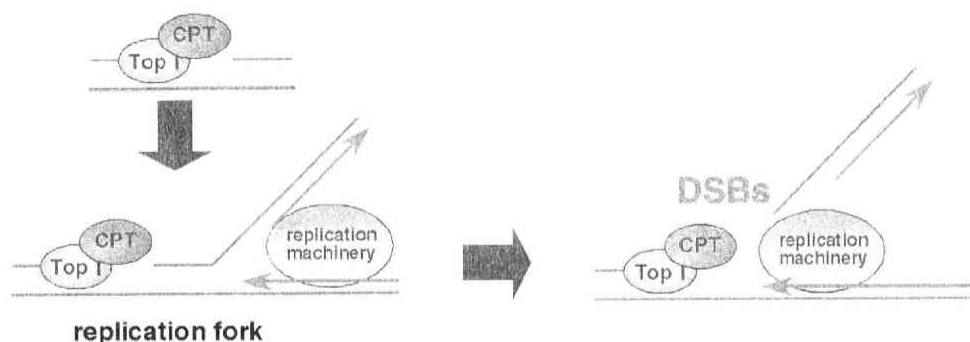
Fig.6 DNA 複製ライセンス化機構

## 第7節 DNA 傷害

細胞が遺伝情報を担うゲノム DNA を安定に維持し、分裂する際にその情報を正確に娘細胞に伝えることは、生物種が存続していく上で必須である。しかし、電離放射線、紫外線 (UV)、化学物質などの外来性 DNA 変異原 (外的要因) だけでなく、細胞内代謝で生じる活性酸素あるいは生理的に起こる脱塩基や脱アミノ化等 (内的要因) によっても、大量の DNA 損傷が絶えず発生している。DNA 損傷の多様さに対応して、生物はゲノムを安定に保持するために、様々な修復機構を進化の過程で獲得してきた。その欠損は、高発がん性、早期老化などの重篤な病態を呈することから、DNA 損傷と修復は、通常の状態でも頻繁に起こっていると考えられる。

UV は、(6-4) 光産物 ((6-4) photoproducts; 6-4PPs) 及びシクロブタンピリミジン二量体 (cyclobutane pyrimidine dimers; CPDs) によって、またアルキル化剤は、プリン体の N-アルキル化または脱プリン (apurin; AP) 部位の形成によって、それぞれ二重鎖 DNA のどちらか一方に化学的修飾・切断を誘発し、DNA 複製の進行を妨げている。

抗がん剤として知られる薬剤の中には、DNA に傷害を与えることでがん細胞の増殖を抑制する薬剤が存在する。カンプトテシンは DNA topoisomerase I (Top I) の阻害剤であるが、培養細胞を用いた解析から S 期の細胞で DNA 二本鎖切断を生じ DNA 修復を誘導することが明らかになっている。Top I は DNA の片側の鎖を切断し、もう一方の DNA 鎖をくぐらせてから切断した DNA 鎖を再結合することにより二本鎖 DNA の捻れを解消する。カンプトテシンは Top I と片側鎖の切断された DNA との複合体 (Top I cleavage complex) に結合し一本鎖 DNA の再結合を阻害する。この状態の DNA 部位に replication fork が到達することにより二本鎖切断が生じると考えられている (Avermann et al., 1988; Tsao et al., 1993) (Fig.7)。



**Fig. 7 CPT による DNA 二本鎖切断の形成機構**

CPT による DSBs の形成。Top I cleavage complex に CPT が結合し一本鎖 DNA の再結合を阻害する。この Top I cleavage complex に replication fork が衝突することにより二本鎖切断が生じることが知られている。

## 第 8 節 DNA 修復機構

UV 及びアルキル化剤による DNA 損傷のほとんどは二重鎖 DNA のうち一方の鎖に局限する化学的修飾・切断でその多くが複製前に速やかに塩基除去修復 (base excision repair; BER)、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER)、ミスマッチ修復 (mismatch repair; MMR) などの除去修復機構により修復される。また、DNA 複製中においても損傷乗り越え合成 (translesion synthesis; TLS) が行われ、DNA 複製の停止を阻止している。

DNA 二本鎖切断は、DNA 複製の過程や電離放射線の被爆などによってしばしば引き起こされ、修復されないまま残ると、チェックポイント機構を活性化したり細胞死を誘導する。つまり DNA 二本鎖切断は細胞にとって致命的となるため、発生した場合にはその修復が細胞にとって急務である。DNA 二本鎖切断の修復機構には少なくとも相同組換え機構を介した修復 (homologous recombination repair; HRR) と非相同 DNA 末端結合 (non-homologous end-joining; NHEJ) の 2 つの機構が存在する。HRR は誤りの少ない修復機構と考えられるのに対し、NHEJ は誤りがちな修復機構である。NHEJ では、Ku70/86 複合体や DNA-Pkcs を必要とし、その両切断末端を削り込んだ後の僅かな相同性をもとに末端ど



うしを結合させる。HRR では細胞内に傷害を受けた領域と相同な二本鎖 DNA と酵母の RAD52 経路において機能するものに相当する一群のタンパク質が必要である (Shinohara et al., 1992)。これらの 2 つの DNA 二本鎖切断修復機構は酵母からヒトまでよく保存されている (Boulton and Jackson, 1996a,b; Siede et al., 1996; Bezzubova et al., 1997; Essers et al., 1997)。ところが、酵母においては HRR が優位に働くのに対し、高等真核細胞においては NHEJ が優位に働いている。これは、高等真核生物と酵母のゲノム構成の違いを反映しているとも考えられている。つまり反復配列が多く、ゲノムの大半が重要な遺伝情報を担っていない高等真核生物では、機能的に重要なエキソンなどに傷害を受ける可能性が低い上、反復配列間の相同組換えが染色体で容易に起こりやすく、ゲノム構造の大きな乱れにつながりやすい。それ故、二本鎖切断を末端どうしの結合で修復させる反応が主たる機構として、進化してきたのかもしれない。これらの修復系の利用の仕方を細胞周期の視点からみると、NHEJ は G0/G1 期に、HRR は late S 期と G2 期で主に利用されている。また、NHEJ と HRR はそれぞれ独立した経路であるにも関わらず、出芽酵母の Mre11、Rad50、Xrs2 は両経路へ関与することが知られている (Haber et al., 1998)。

NHEJ の最初のステップは Ku70 と Ku80 (XRCC5) 複合体が DNA 末端に結合しエキソヌクレアーゼから DNA を守ることから始まり、次いで Ku 複合体に DNA-Pkcs (XRCC7) が結合する。DNA-Pkcs は、Xrcc4-ligase IV 複合体を DNA 末端に誘導する。このとき、Mre11-Rad50-Nbs1 複合体が 3' flaps を、そして Fen1 が 5' flaps を除去し、Xrcc4-ligase IV 複合体の誘導を助けられていると考えられている (Lee et al., 2003; Maser et al., 1997; Nelms et al., 1998; Paull and Gellert, 1999; Trujillo et al., 1998; Wu et al., 1996b)。Artemis は DNA-PK と複合体を形成し、DNA-Pkcs によってリン酸化を受けて、エキソヌクレアーゼ活性を発現し、その活性でヘアピンループ構造を開くことと、NHEJ に過程で生じる 5' または 3' 突出末端を削り込むことをおこなっていると考えられている (Moshous et al., 2001; Ma, 2002)。その他に WRN が Ku よって活性化され、DNA-Pkcs によって抑制されるなどの制御を受けることから、WRN の 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性も NHEJ で働いている可能性も考えられ

ている (Cooper et al., 2000; Yannone et al., 2001; Li and Comai, 2001, 2002)。Xrcc4-ligase IV 複合体が DNA ポリメラーゼ ( $\mu$  の可能性が高い) とともにギャップを埋めることで NHEJ の過程が終了する (Lee et al., 2003) (Fig.8)。

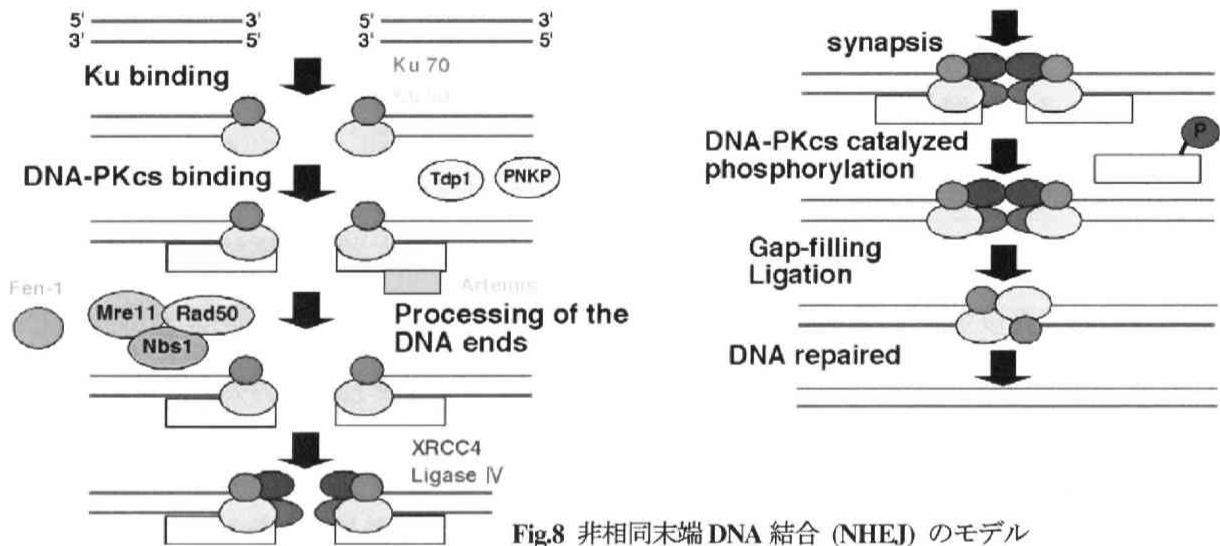


Fig.8 非相同末端 DNA 結合 (NHEJ) のモデル

HRR による DNA 二本鎖切断修復の最初のステップは Mre11-Rad50-Nbs1 の 5'側断端のヌクレアーゼ複合体によるプロセッシングからの 3'側突出の一本鎖 DNA の形成から始まり、そこに一本鎖 DNA 結合タンパク質である replication protein A (RPA) が結合し、DNA を直線化させる。さらにそこに Rad52 が結合し、Rad51 をリクルートする。この Rad51 のリクルートには、BRCA2 の BRC repeat 領域との相互作用が必要であることが最近になり明らかになった (Yang et al., 2002a)。この後 Rad51 は一本鎖 DNA のまわりにヌクレオプロテインフィラメントを形成するが、これは Rad51 パラログ (Rad51B/Rad51C/Rad51D/XRCC2/XRCC3) によって促進される。Rad51 ヌクレオプロテインフィラメント形成後、相同 DNA の検索と鎖交換反応を経て、相同鎖を鋳型とした DNA 合成が始まる。この過程には Rad54 の二本鎖 DNA 依存的 ATPase 活性の働きが必要となる。DNA 合成後、DNA ligation、branch migration そしてホリデイジャンクション構造の解消が起こり、HRR が終了する。ホリデイジャンクション構造の解消には BLM、WRN が関与していると言われている (Mohaghegh et al., 2001; Constantinou et al., 2000; Saintigny et al.,

2002) が、未知の部分が多いのが現状である (Fig.9)。

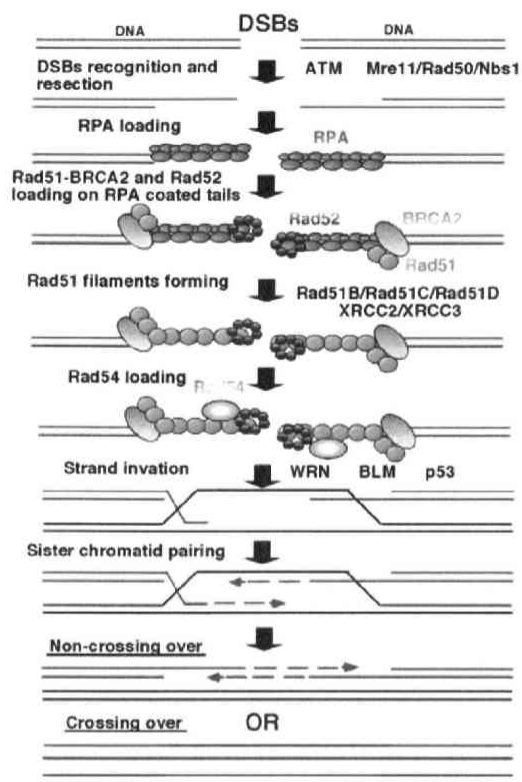
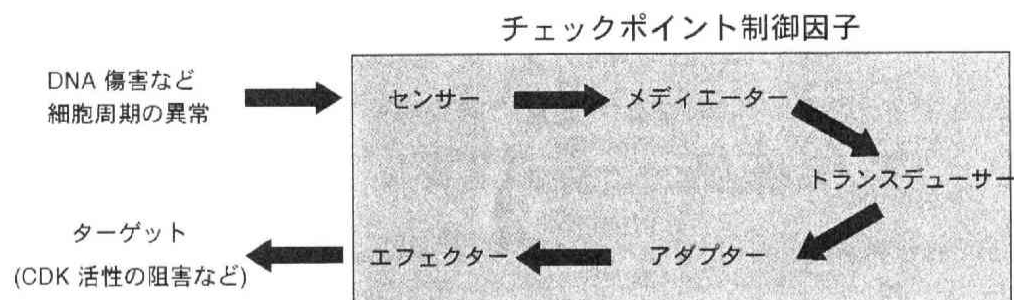


Fig.9 相同組み換え修復 (HR) のモデル

## 第9節 チェックポイント機構

チェックポイント機構とは、DNA に何らかの傷害が起こった場合その傷害が修復されるまで細胞周期を停止させておく機構のことで、チェックポイント機構が正確に機能するためには様々なタンパク質の機能が必要となる。まず、感受因子 (センサーまたはメディエーター) により異常をモニターして検出し情報を発信する。続いて、変換因子 (トランスデューサー) により情報が変換される。この情報を適合因子 (アダプター) が受け取り、様々な作動因子 (エフェクター) に伝えられる。最後に細胞周期進行の中心に位置する CDK などの標的因子 (ターゲット) 活性が制御され細胞周期が停止する。これらの過程には様々な因子による複雑な制御機構が必要とされるが、なかでもタンパク質リン酸化酵素によるリン酸化のカスケード反応が最も重要であると考えられている (Fig.10)。



**Fig.10 チェックポイント機構の制御の素過程**

チェックポイント機構の制御を直接担う因子は、それぞれの機能によって分類されている。開始信号はこれらの因子の連携によってエフェクターに伝達される。エフェクターは最終標的タンパク質（ターゲット）に作用して細胞周期を特定の時期で停止させ、修復のための時間を稼ぐ。

これらの因子は出芽酵母からヒトまで広く高度に保存されており、チェックポイント機構がいかに重要であるかがうかがえる (Table3) (Fig.11)。

|                  | <i>S.cerevisiae</i>            | <i>S.pombe</i>                | <i>Xenopus</i>                | Mammals                                    |
|------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| センサー/<br>メディエーター | Rad24<br>Ddc1<br>Mec3<br>Rad17 | Rad17<br>Rad9<br>Hus1<br>Rad1 | Rad17<br>Rad9<br>Hus1<br>Rad1 | Rad17<br>Rad9<br>Hus1<br>Rad1              |
| トランスデューサー        | Mec1<br>Ddc2<br><br>Tel1       | Rad3<br>Rad26<br><br>Tel1     | ATR<br>???<br><br>ATM         | ATR<br>ATRIP<br><br>ATM                    |
| アダプター            | Rad9<br><br>Mrc1               | Crb2<br><br>Mrc1              | ???<br><br>claspin            | BRCA1? 53BP1<br>TopBP1 MDC1<br><br>claspin |
| エフェクター           | Rad53<br><br>Chk1              | Cds1<br><br>Chk1              | Cds1<br><br>Chk1              | Chk2<br><br>Chk1                           |

**Table 3 チェックポイント関連タンパク質**

出芽酵母、分裂酵母、アフリカツメガエル及び哺乳動物のチェックポイント関連タンパク質をまとめた。

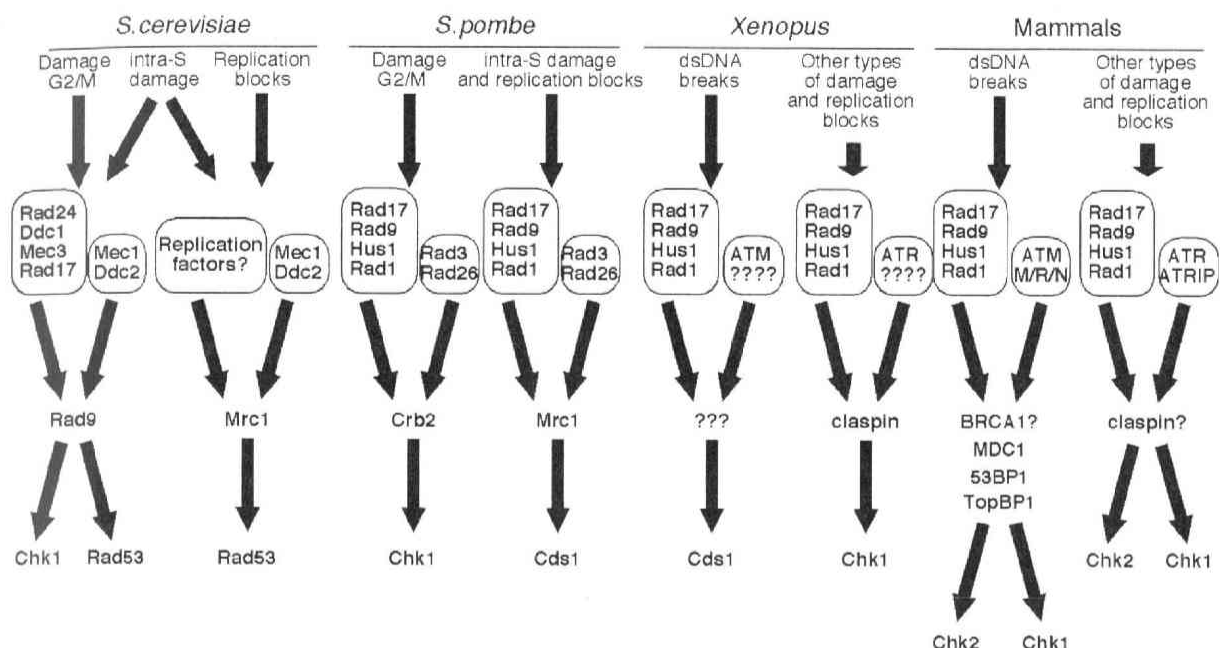


Fig.11 チェックポイント機構へのシグナル発信機構

Rad17 は RFC2-5 と複合体を形成し、Rad9、Hus1 及び Rad1 は共にリング状の複合体を形成している。M/R/N は、Mre11/Rad50/Nbs1 複合体を表している。

毛細血管拡張性失調症 (ataxia telangiectasia; AT) は常染色体劣性の遺伝様式で伝達される疾患であり、プルキンエ細胞の進行性変性に起因する小脳性運動失調、液性および細胞性免疫不全、精神遅滞、生殖器官の発育不全、早期老化、リンパ性悪性腫瘍の発生率の増加など多様な臨床像を呈する。特に、AT 患者の細胞が示す電離放射線への高感受性は、様々な分野の研究者たちが注目してきた点である。これは、がんを発症した AT 患者に対して放射線治療をおこなったところ、非常に深刻な急性放射線障害が現れたことから発見された特徴である。AT 患者細胞では放射線照射後、通常であれば停止するはずの DNA 合成が止まらず、細胞周期が進行してしまう (Painter and Young, 1980)。また、DNA 傷害剤への暴露においても同様の異常な細胞周期の進行が観察される (Kirsch, 1994)。放射線などにより DNA 鎖切断が生じているにもかかわらず細胞周期が進行することで、断片化、欠失、転座などの染色体の不安定化が顕著になる。したがって、AT 原因遺伝子産物である ataxia telangiectasia-mutated protein kinase (ATM) は DNA 損傷の検出から細胞周期の制御へと至る過程、すなわちチェックポイント機構の機能を実現するまでの情報伝達経路上で

重要な役割を果たしていると考えられた。

### PI3K-様チェックポイントキナーゼ (トランスデューサー)

ATM タンパク質はホスファチジルイノシトール-3-OH (PI-3) キナーゼドメインを持つタンパク質リン酸化酵素であり、進化上非常によく保存されている。ATM タンパク質は、様々な DNA の傷害によって活性化される細胞内シグナル伝達経路の制御分子として機能している。また、同じ生物種においても複数の ATM ファミリータンパク質が存在する。アミノ酸配列上、ATM は分裂酵母及び出芽酵母 Tel1 と高い相同性を示し、ATM- and Rad3-related protein kinase (ATR) は分裂酵母 Rad3 及び出芽酵母 Mec1 と高い相同性を示す。他に、PI-3 キナーゼドメインを持つタンパク質として、DNA 修復機構に直接関与する DNA-PKcs や、増殖因子などに応答するヒト mTOR (mammalian target of rapamycin) などがある。

### ATM ファミリータンパク質の細胞周期チェックポイント機構における機能

DNA 傷害からのシグナルを下流に伝達する ATM ファミリータンパク質はチェックポイント機構に非常に重要な役割を担っていると考えられる。ヒトにおいては、ATM は主に電離放射線 (IR) などによる DNA 二本鎖切断発生時のチェックポイント機構に関与し、UV、メチルメタンスルホン酸 (MMS) および DNA 複製阻害剤である hydroxy urea (HU)、アフィディコリンによる DNA 複製阻害時のチェックポイント機構には主に ATR が働くと考えられている。

#### a、G1/S 期のチェックポイント機構

G1/S 期チェックポイントの場合、IR による DNA 傷害が起こると ATM が Chk2 をリン酸化し、これによって活性化された Chk2 がさらに Cdc25A をリン酸化する。リン酸化された Cdc25A はユビキチン-プロテアソーム分解系によって分解される (Mailand et

al., 2000; Falck et al., 2001)。UV に起因する DNA 傷害が生じた場合には、ATR、Chk1、Cdc25A と続くリン酸化カスケードが活性化され、上記と同様に Cdc25A が分解される (Mailand et al., 2000)。Cdc25A は Cdk2 または Cdk4 が活性化するために必要な脱リン酸化反応を触媒する酵素であるが、Cdc25A がリン酸化され、分解されることによって Cdc25A による Cdk2 または Cdk4 の脱リン酸化反応が引き起こされなくなる。この結果、Cdk2 または Cdk4 は不活性型のまま留まることとなり、細胞周期は G1 期で停止する。さらに、IR による DNA 傷害に応じて ATM または ATR が Chk2 (Matsuoka et al., 2000; Melchionna et al., 2000)、p53、Mdm2 をリン酸化し、最終的に細胞内の p53 タンパク質が増加することも認められている (Banin et al., 1998; Unger et al., 1999)。これにより、CKI (cyclin-dependent kinase inhibitor; 主に p21) の転写が活性化し、Cdk2 が阻害されることにより細胞周期が停止する (Fig.12)。

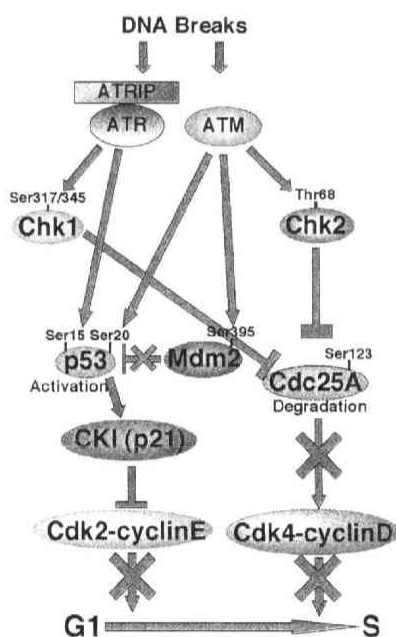


Fig.12 G1/S 期チェックポイント機構

## b、S 期チェックポイント機構

UV や IR により S 期の DNA 複製の正常な進行を妨げた場合には、ATR-Chk1-Cdc25A 経路が活性化する (Zhou et al., 2002; Zhao et al., 2002)。一方、IR などによる DNA 二本鎖

切断が S 期において起こると、ATM が活性化され G1 期チェックポイントの時と同様に Chk2 (Matsuoka et al., 2000; Melchionna et al., 2000)、CDC25A のリン酸化カスケードを経由して CDC25A は分解され、Cdk2 が不活性型のまま留まる (Falck et al., 2001; Kastan, 2001)。Cdk2 は DNA 複製の開始に必要である Cdc45 の活性化に関わるため、Cdk2 の活性化抑制は S 期の進行の遅延となる。この ATM-Chk2-Cdc25A-Cdc45 の経路は DNA 複製を含む様々な細胞周期を阻害する系として考えられている。さらに、DNA 二本鎖切断に応じて活性化された ATM が、Nbs1/Mre11/Rad50 複合体中の Nbs1 (Lim et al., 2000) や、相同組換え機構に関与するがん抑制遺伝子産物 BRCA1 をリン酸化し、活性化することも知られている (Cortez et al., 1999)。BRCA1 は、Nbs1/Mre11/Rad50 複合体や ATM などのタンパク質群と巨大複合体 (BRCA1-associated genome surveillance complex; BASC) を形成する (Wang et al., 2000)。この複合体は DNA 傷害の感知と DNA 修復を結ぶシグナル伝達の要となっていると考えられている。さらに、DNA 二本鎖切断後にその傷害部位においてヒストン H2AX が極めて迅速にリン酸化され、その後に BRCA1 が同じ部位で focus 状の構造体を形成することが観察されている。この H2AX リン酸化反応も ATM ファミリータンパク質により直接触媒されることが明らかになっている (Burma et al., 2001; Ward and Chen, 2001)。この他にも ATM は DNA 傷害に応じて、クロマチン構造の維持に関与する Smc1 (Kim et al., 2002; Yazdi et al., 2002)、転写因子 E2F-1、さらに S 期チェックポイントに関与すると考えられている Mdc1 (Goldberg et al., 2003; Lou et al., 2003; Stewart et al., 2003) のリン酸化もおこなう。Mdc1 は、リン酸化型 H2AX ( $\gamma$ -H2AX) と相互作用し、様々なタンパク質を DNA 傷害部位に誘導していると考えられている (Stewart et al., 2003) (Fig.13)。



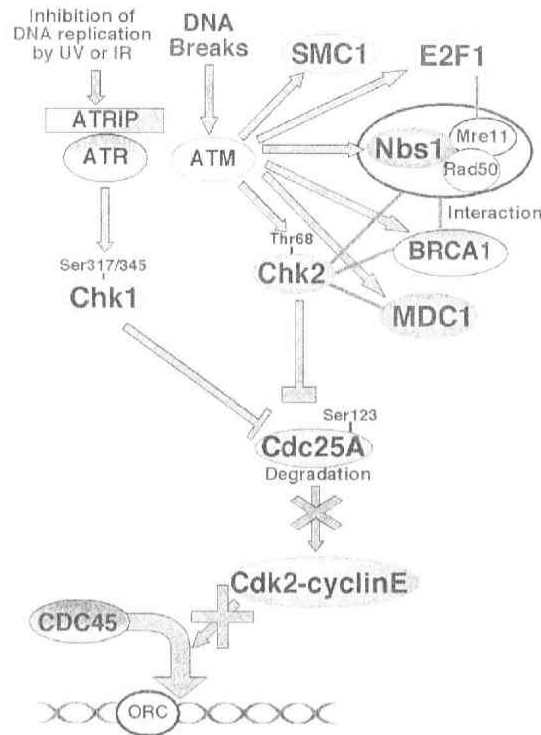


Fig.13 S期チェックポイント機構

### c、 G2/M 期チェックポイント機構

G2/M 期チェックポイントの場合、DNA に傷害が起こると ATM が Chk2 (Matsuoka et al., 1998a; Zhou et al., 2000; Lopez-Girona et al., 2001) を、ATR が Chk1 (Guo et al., 2000) をそれぞれリン酸化し活性化する。Chk1、Chk2 は共に Cdc25C を基質とする。リン酸化された Cdc25C は、14-3-3 と結合し核外へ輸送される (Peng et al., 1997; Blasina et al., 1999; Furnari et al., 1999; Graves et al., 2000; Lopez-Girona et al., 2001)。Cdc25C は Cdc2 が活性化されるために必要な脱リン酸化反応を触媒する酵素であるが、核外に輸送された Cdc25C は Cdc2 の脱リン酸化反応を引き起こせなくなる。この結果、Cdc2 は不活性型のまま留まることになり、細胞周期は G2 期で停止する。また、HeLa 細胞の研究よりリン酸化型の Chk1 によって Cdc25A がリン酸化され G2 期チェックポイント反応が起こることも知られている (Zhao et al., 2002)。さらに、リン酸化された Chk1 が Wee1 をリン酸化することで 14-3-3 との結合を誘起し、これによって Wee1 キナーゼ活性が促進されるこ

ともアフリカツメガエル卵抽出液を用いた解析から示されている (Lee et al., 2001)。Wee1 (Myt1) は Cdc2 をリン酸化することでその活性を抑制するタンパク質であるため、Wee1 のキナーゼ活性の促進は、Cdc2 を不活性型に留める。最近、Cdc25C の活性を調節する 2 種類の新たなタンパク質が見つかった。それらは Plk1 と Plk3 と呼ばれ、Polo-like kinase (PLK) ファミリーに属することが明らかとなっている (Glover et al., 1998; Nigg, 1998)。Plk1 は Cdc25C を活性化する (Elia et al., 2003; Sillje and Nigg, 2003) が、この Plk1 も ATM または ATR の標的となり不活性化される (Smits et al., 2000; van Vugt et al., 2001)。また、Plk1 はチェックポイントタンパク質である Chfr によって安定性の調節を受けていることも知られる (Scolnick and Halazonetis, 2000; Kang et al., 2002)。一方、Plk3 は ATM によって活性化を受け、Cdc25C を不活性化する (Smits et al., 2000; Xie et al., 2001)。この他にも、Cdc2 をリン酸化することにより活性化する CAK タンパク質が p21 によって不活性化されることが知られている (Pines, 1995) (Fig.14)。

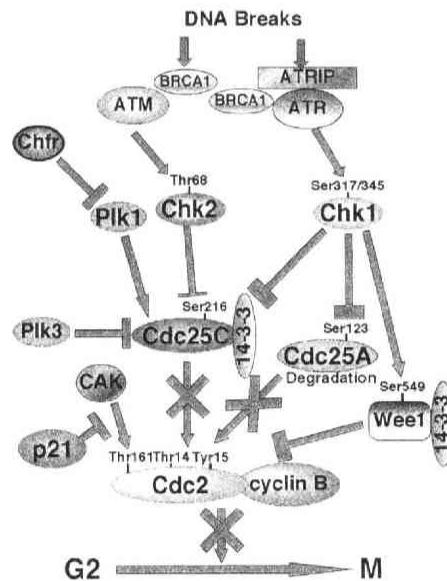


Fig.14 G2/M 期チェックポイント機構

#### d、アフリカツメガエル卵抽出液におけるチェックポイント機構の解析

チェックポイント機構に関する多くの研究は出芽酵母、分裂酵母やヒト培養細胞を中心としておこなわれてきたが、最近になって、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた解

析も盛んにおこなわれてきている。しかしながら、p53 は MBT まで活性化しないことが知られており、さらに、細胞周期に G1 期と S 期が存在しないため、卵抽出液中のチェックポイント機構は体細胞でみられるチェックポイント機構とは若干異なると考えられている。Costanzo らは、切断したプラスミド DNA を用いて、チェックポイント機構を活性化し、DNA 複製開始の阻害作用について解析した。その結果、DNA 傷害に応じて、DNA 複製の開始に必要な cyclin E/Cdk2 の活性が抑制されることにより DNA 複製が阻害されることを見いだした (Costanzo et al., 2000)。また、aphidicolin や紫外線または MMS などで DNA 複製を阻害すると、xChk1 がリン酸化され、xCds1 (xChk2) はリン酸化されないことが示されている。さらに、xCds1 (xChk2) のリン酸化は一本鎖 DNA や切断したプラスミドを卵抽出液に加えることにより起こることを見だし、卵抽出液において、xChk1 と xCds1 (xChk2) が異なるチェックポイント機構で機能していることを明らかにした (Guo et al., 2000; Kumagai et al., 1998)。これらの解析からアフリカツメガエルの卵抽出液においても、チェックポイント機構が働き、ATM ファミリータンパク質の活性化やそれに続く Chk1/Chk2 の活性化機構が存在することが明らかとなった。また、チェックポイントタンパク質である claspin はアフリカツメガエルで最初に発見され (Kumagai et al., 2000)、後の研究で claspin のホモログである Mrc1 が出芽酵母において同定された (Osborn et al., 2003)。したがって、アフリカツメガエル卵抽出液を用いたチェックポイント機構の解析は、今後のチェックポイント機構の発展にとっても重要な情報をもたらしてくれるだろう。

## 第 10 節 本研究の目的

細胞内には多くの DNA ヘリカーゼの存在が確認されているが、とくに RecQ ファミリーに属する DNA ヘリカーゼ (RecQ ヘリカーゼ) はゲノム安定性維持機構に関与すると考えられている。RecQ ヘリカーゼは大腸菌の RecQ タンパク質と高い相同性を有する DNA

ヘリカーゼの総称であり、ヒトにおいては RecQL1、BLM、WRN、RecQL4、RecQL5 の 5 種類が存在する。このうち、RecQL4 は、早期老化や骨形成異常を特徴とする Rothmund-Thomson 症候群の原因遺伝子産物であることが明らかになっている。これまでに、RecQL4 が DNA 複製の開始に必須な一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体 RPA のクロマチン結合に要求されること、DNA 傷害時に DNA 二本鎖切断 (DSB) に対する相同組換え修復機構で機能する Rad51 と局在が一致することが示されている。しかしながら、DNA 複製の開始、進行や DSB 修復における RecQL4 の分子レベルでの作用機序についてはほとんど報告されていない。そこで本研究では、RecQL4 の機能の生化学的な解析を目的として、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系をもちいた検討をおこなった。

## 第3章 結果

### 第1節 *EcoRI* による DNA 二本鎖切断の誘発に応じた RecQL4 の挙動

BS 患者細胞では正常細胞に比べて約 10 倍も SCE が亢進していることが知られる (Kurihara et al., 1987)。また、正常の個体では生殖細胞でしか起こらないはずの相同染色体間の組換えが体細胞レベルで確認されている (German, et al., 1993)。WS 患者細胞では、ゲノム不安定性および DNA 傷害剤に対する感受性が認められている (Salk et al., 1985; Monnat et al., 1992; Pichierri et al., 2000a; Pichierri et al., 2000b)。また、WRN と BLM は DNA 損傷時に HRR に関与する Rad51 と局在が一致することが報告されている (Bischof et al., 2001; Sakamoto et al., 2001)。これらのことから、WRN、BLM は DNA 損傷修復、とくに HRR と密接な関係があると考えられる。

また、私は修士課程において、RecQL4 が *EcoRI* によって誘発される DSB の HRR 経路に関与することを示唆する結果を得た (熊田修論)。

以上のような背景をもとに、HRR 機構における RecQL4 の機能を詳細に理解することを目的として以下の解析を行った。精子核クロマチンを添加したアフリカツメガエル卵抽出液に *EcoRI* を加えることによって、DSB を誘導した。その卵抽出液から、クロマチン画分を単離し、ヒストン H3 (H3) 抗体、リン酸化型ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX) 抗体、Ku70 抗体、Rpa30 抗体、RecQL4 抗血清を用いてクロマチン画分中の H3、 $\gamma$ H2AX、Ku70、Rpa30 および RecQL4 を検出した。また、*EcoRI* を添加していない卵抽出液から単離したクロマチン画分における *EcoRI* 添加時と同様のタンパク質を検出し、その結果を対照として用いた (Fig.15)。

Fig.15A (none) は今回用いた条件における DNA 合成量の経時的変化を表したグラフである。この実験において、DNA 複製以外の DNA 修復等に由来する DNA 合成量はごくわ

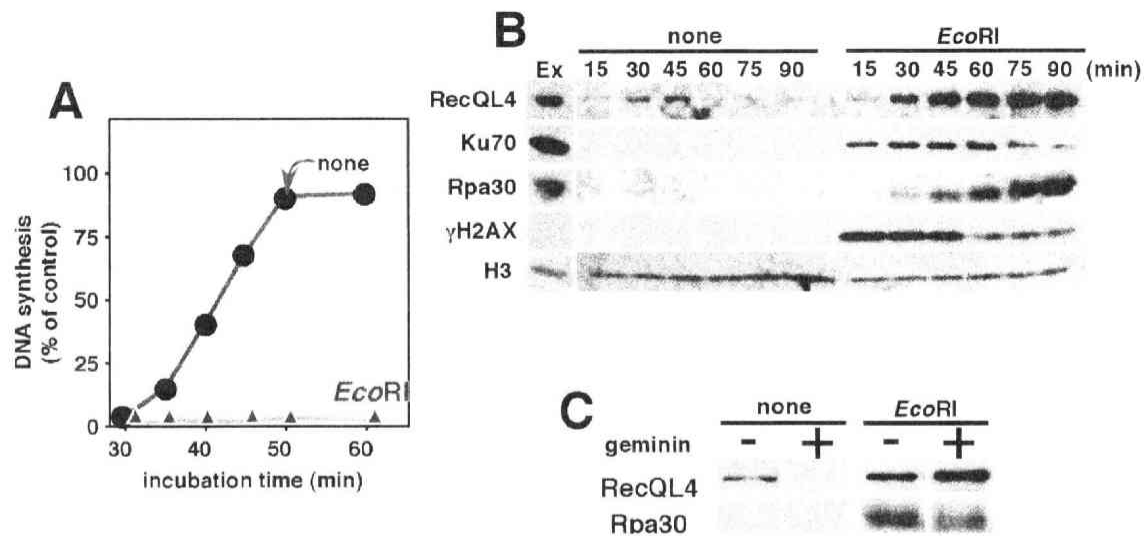


Fig.15 アフリカツメガエル卵抽出液における RecQL4 の挙動の解析

A. DNA 複製活性の経時的変化。B. *EcoRI* の有無による RecQL4、Ku70、Rpa30、γH2AX の経時的変化。ヒストン H3 は loading control として検出した。C. Rpa30 と RecQL4 のクロマチン結合に対する geminin の影響を western blotting により検討した。

ずかであり無視し得ることは確認している。アフリカツメガエル卵抽出液中に精子核クロマチンを添加して 23°C で反応させると、核形成が観察される 30 分後くらいから DNA 複製が開始され、60 分後までにほぼ完了する。この反応系よりクロマチン画分を単離したのち、RecQL4 を western blotting により検出した結果 (Fig.15B, “none”, RecQL4)、RecQL4 は 30 ~ 45 分をピークにクロマチンへ結合し、そのクロマチン結合は DNA 複製の進行とともに減少した。

上記の実験においても同様に DNA 複製が進行していたことを確認するため、RecQL4 の検出をおこなったクロマチン画分中に存在する Rpa30 の western blotting による検出もおこなった。RPA は DNA 複製開始に応じて一過的にクロマチン上に結合し、DNA 複製の進行に伴い速やかにクロマチンから解離することが知られる (Mimura et al., 2000; Walter and Newport, 2000; Eltsov et al., 2000)。したがって、今回得られた結果は、これまでに知られている DNA 複製に応じた RPA の挙動を再現しており (Fig.15B, “none”, Rpa30)、この実験の反応溶液中においても DNA 複製が通常通り進行していたことが確認された。また、DNA 複製中に有意な DNA 修復が起こっていないことを確認するため、クロマチン画分

に存在する Ku70、 $\gamma$ H2AX の検出もおこなった (Fig.15B, "none", Ku70 and  $\gamma$ H2AX)。Ku70 は DSB 修復に関与していると考えられているタンパク質であり、 $\gamma$ H2AX は DSB の指標となることが報告されている (Rogaku et al., 1998)。今回、Ku70 および  $\gamma$ H2AX の顕著なクロマチンへの結合が観察されなかったため、本実験において DSB が強く誘起されている可能性は低いことが確認された。これらの結果より、DNA 複製中の RecQL4 のクロマチン結合は、DNA 複製開始に伴ってクロマチンに結合し、DNA 複製の進行とともにクロマチン上から解離していくことが示唆された。

次に、*EcoRI* によって DSB を誘発した条件において上記と同様な解析をおこなった。Fig.15A (*EcoRI*) は今回用いた条件における DNA 合成量の経時的变化を表したグラフである。*EcoRI* は DNA と共存させるのみで DSB を生成するために、DNA 複製はチェックポイント機構により抑制される (Kobayashi et al., 2002)。

卵抽出液中より経時的に単離したクロマチン画分について、H3、 $\gamma$ H2AX、Ku70、RPA および RecQL4 の検出を western blotting によりおこなった。RPA は DSB が生成すると、損傷部位に比較的長期間に渡って蓄積する。また、Ku70 は RPA と同様、DSB の生成により損傷部位に結合する。さらに、ヒストン H2AX は DSB の誘発によってリン酸化されることが報告されており、今回の条件においてクロマチン画分での  $\gamma$ H2AX の顕著な増大が観察された。したがって、Rpa30、Ku70 および  $\gamma$ H2AX の結果から、本実験において *EcoRI* 添加抽出液中に存在する精子核クロマチンに十分な DSB が生成されていることが示唆された (Fig.15B, "*EcoRI*", Rpa30, Ku70 and  $\gamma$ H2AX)。このとき、RecQL4 のクロマチン画分への顕著な移行が観察された。

MCM 複合体のクロマチンへの結合を阻害することで DNA 複製開始を抑止する geminin を、*EcoRI* を添加していない抽出液に加えたところ、RecQL4 および Rpa30 のクロマチンへの移行が消失した (Fig.15C)。これは、このとき見られる RecQL4 のクロマチン結合が DNA 複製開始に必要な MCM 複合体のクロマチン結合に依存していることを示しており (Fig.16)、以前に報告された RecQL4 の挙動と一致する結果である (Sangrithi et al., 2005)。

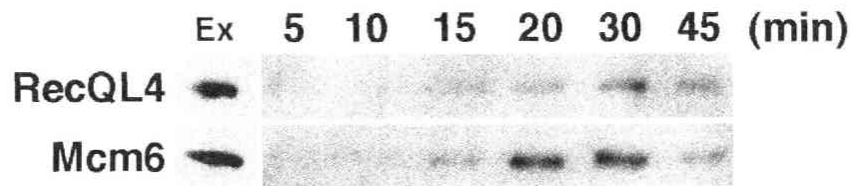


Fig.16 RecQL4 と Mcm6 のクロマチン結合の比較

一方、*EcoRI* 処理によって誘起される RecQL4 のクロマチン結合に対しては geminin の有無による顕著な影響は認められなかった。以上の結果より、*EcoRI* で誘発された RecQL4 のクロマチン結合は DNA 複製開始に機能するものとは異なり、DSB に呼応して起こっていることが示唆された。

## 第 2 節 RPA 除去抽出液における RecQL4 の挙動

DSB 修復において、RPA は Rad52 タンパク質と相互作用し、この相互作用が相同組換え修復 (HRR) に必須であることが明らかになっている。また、RPA が HRR に伴う DNA 鎖交換反応に関与するタンパク質の活性を促進することも示されている (Moore et al., 1991)。一方、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系において RPA と Ku80 が DSB 近辺で共局在することが示されている (Grandi et al., 2001)。このことより、RPA を卵抽出液から除くことによって、HRR を不活化し、さらに非相同 DNA 末端結合 (NHEJ) に影響を与えることができると予想される。そこで、RecQL4 が DSB 修復機構に関与するならば RecQL4 の結合が RPA 除去によって影響を受けるはずであると考え、抗 Rpa30 抗体を用いて RPA をアフリカツメガエル卵抽出液から除去した。あらかじめ抗体を protein A-Sepharose とインキュベートして得た抗体結合 protein A-Sepharose を卵抽出液に懸濁し、4°C で 1 時間攪拌した。こののち protein A-Sepharose を除き、得られた抽出液を RPA 免疫除去抽出液とした。抗 Rpa30 抗血清のかわりに免疫前血清を用いたものを mock 処理抽出液とし、対照として用いた (Fig.17)。



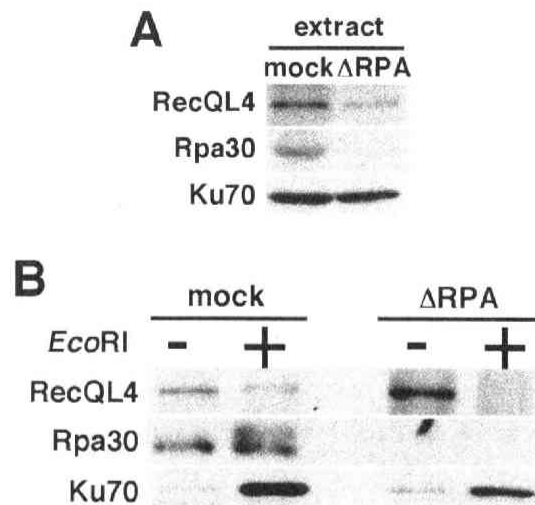


Fig.17 Rpa30 免疫除去卵抽出液における RecQL4 のクロマチン結合の変化

A. mock 処理抽出液 (mock) と Rpa30 免疫除去抽出液 ( $\Delta$ Rpa30) 中の RecQL4、Rpa30 および Ku70 を western blotting により検出した。B. 各卵抽出液から単離したクロマチン画分における RecQL4、Rpa30 および Ku70 を western blotting により検出した。

Fig.17A は、卵抽出液中のタンパク質を検出したものであり、これより RPA タンパク質の免疫除去効率を確認した。ここで用いた実験条件では、卵抽出液 0.025  $\mu$ L 中の Rpa30 を検出することが可能であったが (data not shown)、SDS-PAGE に供した 3  $\mu$ L の免疫除去抽出液中には Rpa30 は検出されなかった。したがって、免疫除去操作による抽出液の希釈 (2 倍希釈以下) を考慮に入れると、少なくとも 98% の RPA が卵抽出液から除去されたことが確認された。

*Eco*RI を添加した mock 処理抽出液および RPA 免疫除去抽出液に精子核 DNA を添加し、23°C で 75 分インキュベーションした。インキュベーション後、クロマチン画分を単離し、Rpa30、Ku70 および RecQL4 を western blotting により検出した (Fig.17B)。mock 処理抽出液においてそれぞれのタンパク質は、無処理の抽出液で観察されるものと同様のクロマチン画分への移行が確認された。一方、RPA 免疫除去抽出液中のクロマチン画分には Rpa30 は検出されなかった。このとき、Ku70 はクロマチン画分中に検出されたが RecQL4 は検出されなかった。これに対して、*Eco*RI 非存在化では RPA 免疫除去抽出液においても RecQL4 のクロマチン結合は検出された。このことより、DSB に応じた Ku70 のクロマチン結合および DNA 複製開始時の RecQL4 のクロマチン結合は RPA が機能する以前に誘発

されるのに対し、*EcoRI* により誘発される RecQL4 のクロマチン結合は、RPA の存在に依存していることが示された。これらの結果は、DSB 修復機構に RecQL4 が関与している可能性を支持するものである。

### 第 3 節 Rad51 のクロマチン結合の阻害による RecQL4 の挙動の変化

最近、HeLa 細胞において RecQL4 が Rad51 依存的な HRR に関与していることが示唆された (Petkovic et al., 2005)。そこで、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系において DSB によって誘発された RecQL4 のクロマチン結合が Rad51 に依存しているかを検討するため、以下の知見を考慮し Rad51 のクロマチン結合を阻害する組換えタンパク質を作成した。

breast cancer susceptibility gene 2 産物 (BRCA2) は、3418 アミノ酸からなる分子量約 318 kDa のタンパク質である。BRCA2 は、体細胞分裂時の S 期において核内に局在しており、減数分裂時においても高く発現している。ヒト BRCA2 の 990 番目から 2100 番目のアミノ酸残基の間には、生物種間で高度に保存されている 8 つの配列が存在しており、これは BRC repeats (repeats in BRCA2 gene) と呼ばれている。BRC repeats はそれぞれ約 30 アミノ酸から構成されており、酵母の 2-ハイブリットスクリーニングと *in vitro* の実験系によって BRC repeats が Rad51 と相互作用することが報告されている。最近、7 量体リング構造を形成している Rad51 の ATPase ドメインと BRCA2 の BRC repeat region が結合し (Fig.18)、リング構造が壊れ (Shin et al., 2003)、こののちに RPA フィラメントを形成している DNA 上に Rad51 の結合が誘導されることが報告されている (Davies et al., 2001; Pellegrini et al., 2002) (Fig.19)。

また、BRCA2 の BRC3/4 のみを細胞内で過剰発現させると、Rad51 の核局在形成が抑制されること (Pellegrini et al., 2002)、BRC4 が Rad51-DNA 複合体形成を阻害すること (Davies et al., 2001) も報告されている。これらのことより、アフリカツメガエル卵抽出液中に BRC4

を大量に添加すれば、Rad51 のクロマチンへの結合を阻害できるのではないかと考え、hBRCA2 の BRC4 タンパク質を発現、精製した (第 5 章 実験材料および方法参照)。この組換えタンパク質を用いて以下の実験をおこなった。

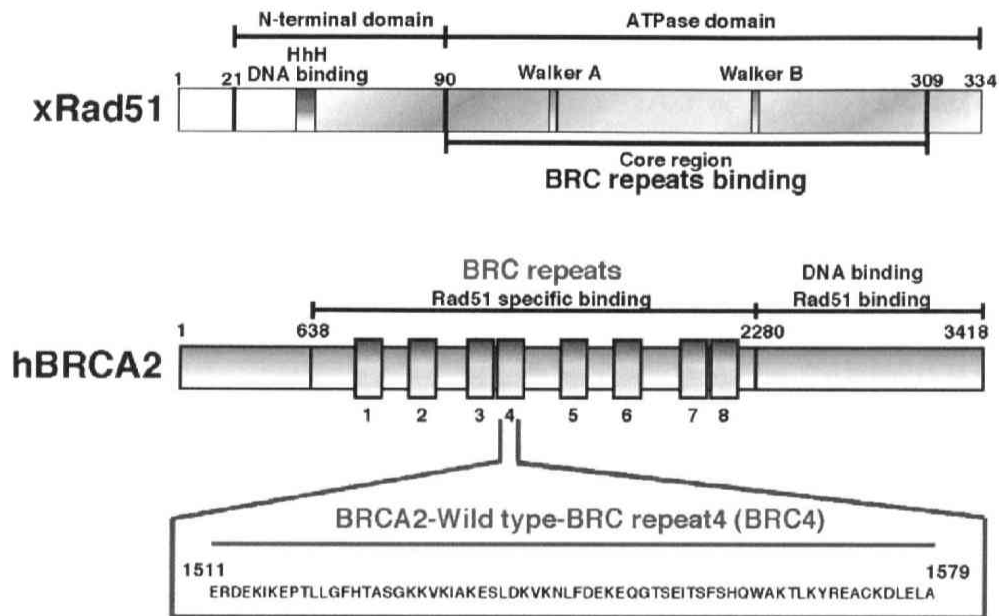


Fig.18 xRad51 および hBRCA2 の構造

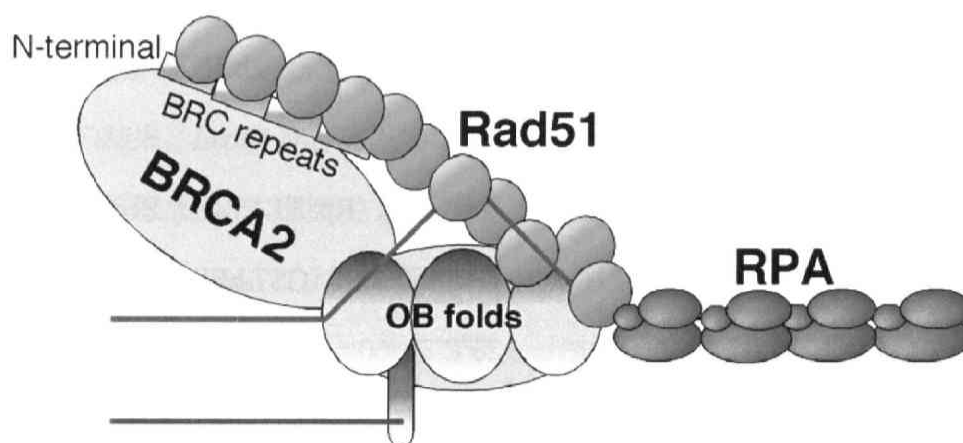


Fig.19 BRCA2 による Rad51 のクロマチンへの誘導

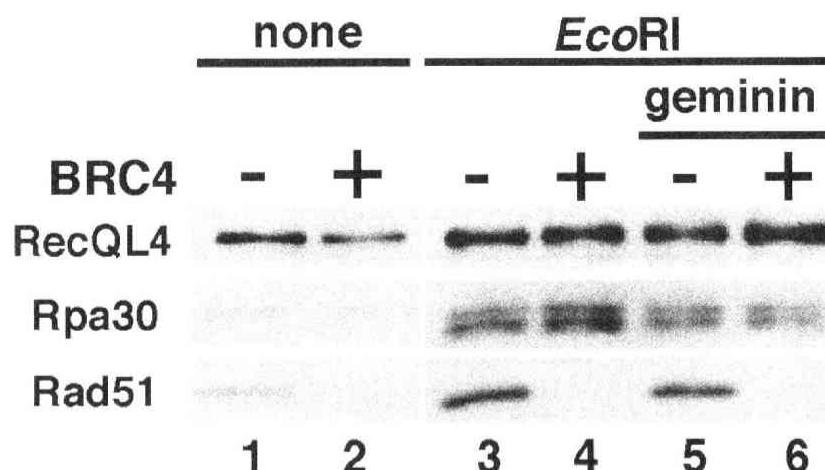


Fig.20 BRC4 により Rad51 のクロマチン結合を阻害した時の RecQL4 のクロマチン結合。RecQL4、Rpa30 および Rad51 のクロマチン結合に対する GST-hBRC4 の影響を western blotting により検討した。

まず始めに、アフリカツメガエル卵抽出液中において hBRC4 が DSB によって誘発される Rad51 のクロマチンへの移行を阻害できるのかを確認するために、精製した GST-hBRC4 を添加した卵抽出液、対照となる緩衝液を添加した卵抽出液のそれぞれに精子核 DNA および *EcoRI* を添加し、23°C で 60 分インキュベーションした。インキュベーション後、クロマチン画分を単離し、western blotting によって Rad51 を検出した (Fig.20, Rad51)。

その結果、卵抽出液に GST-BRC4 を添加したとき、Rad51 のクロマチン結合が検出されなくなった。このことより、アフリカツメガエル卵抽出液中においても、hBRC4 が Rad51 のクロマチン結合を阻害していることが確認され、卵抽出液の反応系の中で Rad51 の機能を抑制することが可能になった。

次に、Rad51 のクロマチン結合を抑制した条件下で、Rpa30 および RecQL4 の DSB の生成に応じた挙動の変化について検討した。緩衝液または GST-hBRC4 を添加した卵抽出液に、精子核 DNA および *EcoRI* を添加し、23°C で 60 分インキュベーションしたのちにクロマチン画分を単離した。クロマチン画分中のそれぞれのタンパク質は、western blotting により検出した (Fig.20, RecQL4 and Rpa30)。

緩衝液を添加した場合にも、何も添加していない場合と比較して各タンパク質の挙動に変化は観察されなかったため、今回用いた緩衝液の影響は無視できると考えた (data not

shown)。GST-hBRC4 を添加することで Rad51 のクロマチン画分への移行を阻害した条件下でも、Rpa30 および RecQL4 のクロマチンへの結合に顕著な変化は観察されなかった。この結果より、RecQL4 のクロマチン結合は Rad51 の機能に依存しないことが示唆された。

## 第 4 節 チェックポイント機構および DNA-PK の阻害による

### RecQL4 の挙動の変化

これまでの結果より、DSB によって誘発された RecQL4 のクロマチン結合は Rad51 の機能に依存せず、RPA に依存することが示唆された。これより、RecQL4 は Rad51 に依存しない DNA 修復機構に関与していると考えられた。DSB によって誘発される RecQL4 の機能を解明するための更なる詳細な知見を得るため、DNA 修復の上流で機能すると考えられているチェックポイント機構、DSB 修復機構である NHEJ と RecQL4 の挙動との間の関係を検討した (Fig.21)。

まず始めに、ATM/ATR を阻害しチェックポイント機構を阻害する caffeine および ATM に加えて NHEJ の上流で機能する DNA-Pkcs も阻害する wortmannin を卵抽出液に加えた。この卵抽出液から、クロマチン画分を単離し、H3 抗体、Rpa30 抗体、Ku70 抗体、RecQL4 抗血清を用いてクロマチン画分中の H3、Rpa30、Ku70 および RecQL4 を検出した (Fig.21B, lane1-3)。その結果、*EcoRI* 非存在下では caffeine または wortmannin による RecQL4 のクロマチン結合に顕著な変化は観察されなかった。これに対し、Rpa30 のクロマチン結合は caffeine または wortmannin によって僅かに増加した。この Rpa30 のクロマチン結合の増加は、caffeine または wortmannin によってチェックポイント機構が阻害され、DNA 複製が亢進したためだと考えられた (Fig.21A, “none”)。次に、DSB によって誘発された RecQL4 のクロマチン結合に対する caffeine と wortmannin の影響を検討したが、RecQL4 のクロマチン結合に顕著な変化は観察されなかった (Fig.21B, lane4-6)。このとき、DSB によって抑制された DNA 複製が caffeine または wortmannin によるチェックポイント機構の阻害に

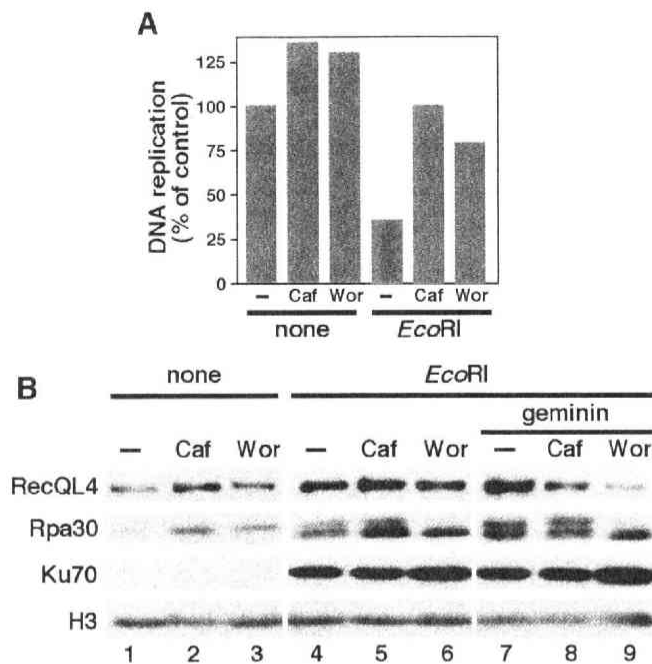


Fig.21 caffeine および wortmannin による RecQL4 のクロマチン結合に対する影響。A. 種々の条件における DNA 複製活性。B. 様々な条件下で単離したクロマチン画分で RecQL4、Rpa30、Ku70 を western blotting により検出した。ヒストン H3 は loading control として用いた。

よって回復していることが観察された (Fig.21A, “EcoRI”)。したがって、このとき観察された RecQL4 のクロマチン結合は DSB と DNA 複製に依存していることが示唆された。そこで、DNA 複製による RecQL4 のクロマチン結合への影響を排除する目的で、DNA 複製の阻害タンパク質である geminin を添加した卵抽出液を用いて上記と同様な実験をおこなった (Fig.21B, lane7-9)。その結果、DSB によって誘発される RecQL4 のクロマチン結合は caffeine および wortmannin 添加により有意に減少した。このような条件において、RecQL4 と同じ RecQ ファミリーに属する WRN のクロマチン結合に顕著な変化は観察されなかった (Fig.22)。したがって、ここで見られる caffeine と wortmannin の作用は RecQL4 に特異的であることが示唆された。また、DSB によって誘発される RecQL4 のクロマチン結合への影響は ATM/ATR を阻害する caffeine よりも ATM/DNA-Pkcs を阻害する wortmannin の方が顕著であったため、RecQL4 は DNA-PKcs が寄与する NHEJ で機能することが示唆された (Asaad et al., 2000; Hashimoto et al., 2003)。このとき、Ku70 のクロマチ

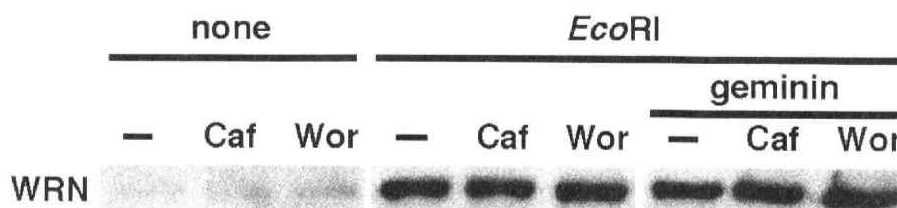


Fig.22 caffeine および wortmannin による WRN のクロマチン結合に対する影響

ン結合は wortmannin を添加した条件でのみ若干増加した。これは、Ku70 が NHEJ において DNA-Pkcs の上流で機能しているためであると考えられる。

## 第 5 節 ChIP 法を用いたクロマチン上の

### RecQL4、Ku70 および Rad51 の位置関係の解析

これまでの結果から、RecQL4 が NHEJ 修復に関与している可能性が示唆された。そこで、DSB 誘発時のクロマチン上における RecQL4 と Ku70 の関係性を解析する目的で chromatin-immunoprecipitation (ChIP) (第 5 章 実験材料および方法参照) による検討をおこなった (Fig.23)。DSB によって RecQL4、Ku70 および Rad51 が結合しているクロマチン (Fig.23B, “input”)(Fig.20, Fig.21B 参照) を単離し、単離したクロマチンに対して超音波処理をおこなうことにより約 300 bp の DNA 断片に分断した。分断したクロマチン画分を抗 RecQL4 抗血清を用いて免疫沈降し、免疫沈降画分中の RecQL4、Ku70 および Rad51 の有無を western blotting により検討した。このとき、抗 RecQL4 抗血清のかわりに免疫前血清を用いたものを mock 処理抽出液とし、対照として用いた (Fig.23, “ChIP”)。その結果、RecQL4 免疫沈降複合体に Ku70 は検出されたが、Rad51 は検出されなかった。また、卵抽出液中において RecQL4 と Ku70 または Rad51 が直接または間接的に相互作用していないことが観察された (Fig.24)。これらの結果は、DSB に応答して RecQL4 が Ku70 の近辺のクロマチン上に結合する現象を捉えており、RecQL4 が Ku70/80 複合体に依存した NHEJ 修復に関与していることを示唆している。

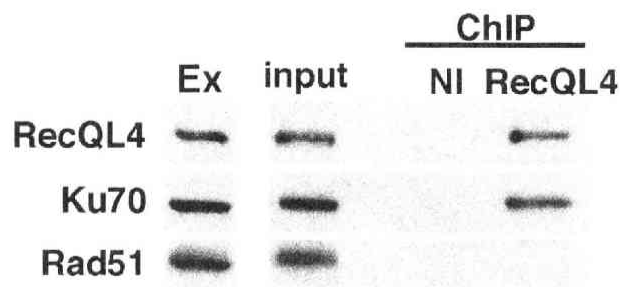


Fig.23 DSB 誘発時に RecQL4 の近傍に結合するタンパク質。Ex: 卵抽出液 1  $\mu$ L。Input: 超音波処理後の可溶性画分。ChIP に使用した量の 20%に相当する量を使用した。ChIP: 免疫前血清 (NI) または抗 RecQL4 抗体 (RecQL4) により免疫沈降した画分。各画分中の RecQL4、Ku70 および Rad51 を western blotting により検出した

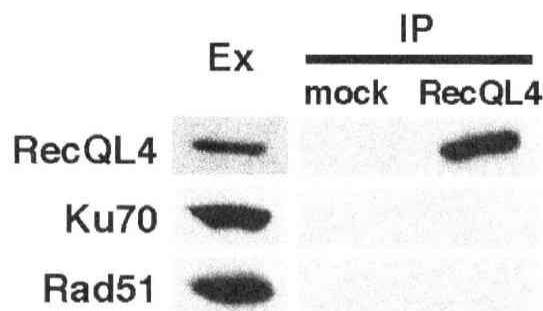


Fig.24 卵抽出液中における RecQL4 と Ku70、Rad51 の相互作用。Ex: 卵抽出液 1  $\mu$ L。IP: 免疫前血清 (mock) または抗 xRecQL4 抗体 (RecQL4) により免疫沈降した画分。各画分中の RecQL4、Ku70 および Rad51 を western blotting により検出した

## 第 6 節 RecQL4 免疫除去卵抽出液における $\gamma$ H2AX の挙動の変化

これまでに観察された DSB に誘発される RecQL4 のクロマチン結合の意義を検討する目的で、DSB の指標である $\gamma$ H2AX の量の変化を観察する $\gamma$ H2AX 法 (第 5 章 実験材料および方法参照) をおこなった。

解析を進めるために、抗血清を用いて RecQL4 をアフリカツメガエル卵抽出液から除去した。あらかじめ抗血清を protein A-Sepharose とインキュベートして得た抗体結合 protein A-Sepharose を卵抽出液に懸濁し、4°C で 1 時間攪拌した。こののち protein A-Sepharose を



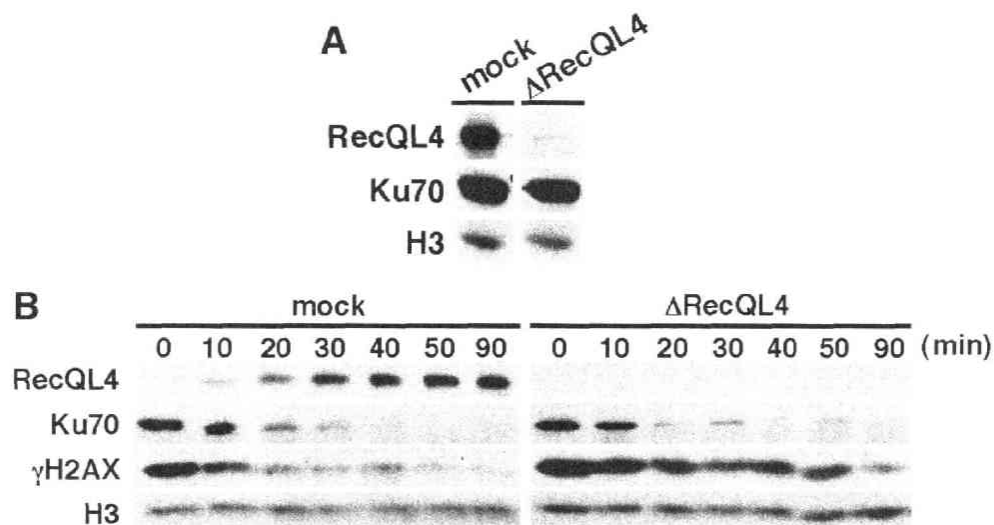


Fig.25 RecQL4 免疫除去卵抽出液における $\gamma$ H2AX の挙動の変化。A. mock 処理抽出液 (mock) および RecQL4 免疫除去抽出液 ( $\Delta$ RecQL4) 中の RecQL4、Ku70、ヒストン H3 を western blotting により検出した。B.各卵抽出液から経時的に単離したクロマチン画分中の RecQL4、Ku70、 $\gamma$ H2AX を western blotting により検出した。ヒストン H3 は loading control として用いた。

除き、得られた抽出液を RecQL4 免疫除去抽出液とした。抗 RecQL4 抗血清のかわりに免疫前血清を用いたものを mock 処理抽出液とし、対照として用いた。

各抽出液を SDS-PAGE にて展開し、抽出液中の RecQL4 を western blotting により検出することで、免疫除去の効率を検討した。ここで用いた実験条件では、卵抽出液 0.05  $\mu$ L 中の RecQL4 を検出することが可能であったが (data not shown)、SDS-PAGE に供した 3  $\mu$ L の免疫除去抽出液中には RecQL4 は検出されなかった (Fig.25A)。したがって、免疫除去操作による抽出液の希釈 (2 倍希釈以下) を考慮に入れると、少なくとも 95% の RecQL4 が卵抽出液から除去されたことが確認された。また、各抽出液中の H3 及び Ku70 を検出したところ、mock 処理抽出液と RecQL4 免疫除去抽出液を比較して差が観察されなかった。この実験操作によっても RecQL4 以外のタンパク質量には影響は無いと考えられた。

得られた RecQL4 免疫除去抽出液と mock 処理抽出液に *Eco*RI を添加し、精子核 DNA と 23°C で 5 分間インキュベートして DSB を誘発したクロマチン画分を単離した。単離したクロマチンに *Eco*RI 未処理の同じ抽出液を添加し、23°C でインキュベート後、クロマ

チン画分を再度単離した。経時的に得られたクロマチン画分中の RecQL4、Ku70、H3 および $\gamma$ H2AX を western blotting により検出した (Fig.25B)。

RecQL4 免疫除去卵抽出液中の $\gamma$ H2AX は、mock 処理卵抽出液中の $\gamma$ H2AX と比較して顕著な減少の遅延が観察された。この結果より、RecQL4 は DSB 修復に機能していることが示唆された。一方、 $\gamma$ H2AX の消失の遅延は DSB 修復の初期過程において顕著であるのに対して (Fig.25B, “10 ~ 20 min”), RecQL4 のクロマチン結合は後期課程において顕著に検出された (Fig.25B, “mock”)。さらに、RecQL4 免疫除去卵抽出液中の Ku70 のクロマチン上での挙動は mock 処理卵抽出液の Ku70 の挙動の変化と比較して顕著な変化は観察されなかった。この結果は、RecQL4 が DSB 修復において Ku70 の下流で機能している可能性を示唆している。

以上の結果は、RecQL4 が DSB 修復機能、特に NHEJ において機能していることを示唆すると同時に、RecQL4 が複数の DSB 修復経路に関与する可能性を提示するものである。

## 第7節 aphidicolin (APH) による DNA 複製の障害と

### RecQL4 の挙動の解析

BLM がホリデイジャンクションに結合し ATP 依存的に branch migration を促進することが明らかとなり、複製フォークの安定化に関わっていることが示唆された (Karow et al., 2000)。これらを始めとする多くの知見より、BLM などの RecQ ヘリカーゼはこのような DNA 複製停止からの回復に重要な役割を果たしている可能性が考えられている。そこで、aphidicolin (APH) によって DNA 複製の正常な進行に障害を与えた場合における RecQL4 の挙動の解析をおこなった。

DNA 複製において機能する DNA ポリメラーゼを阻害する APH をアフリカツメガエル卵抽出液に添加し、DNA 複製フォークの正常な進行を障害した。その卵抽出液からクロマチン画分を単離し、Rpa30 抗体および RecQL4 抗体を用いてクロマチン画分中の Rpa30 および RecQL4 を検出した (Fig.26)。

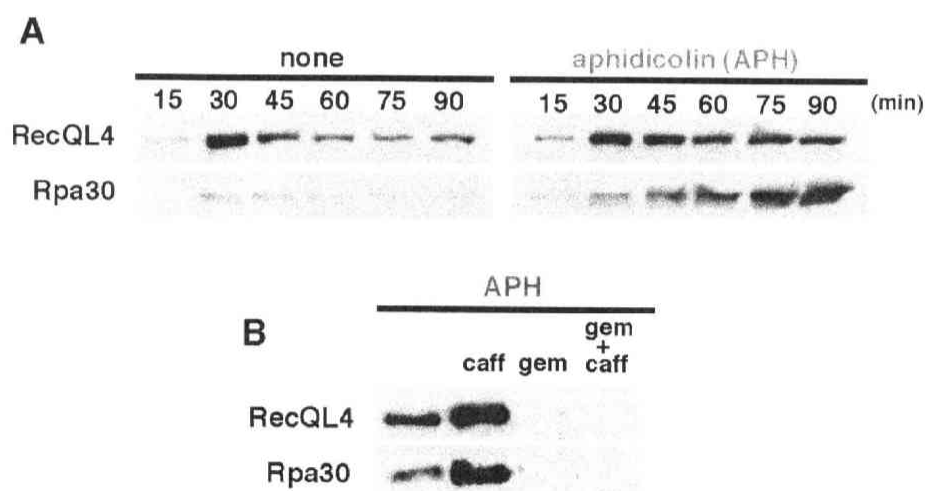


Fig.26 aphidicolin (APH) 処理時の RecQL4 の挙動の変化。A. DNA が正常に進行している卵抽出液と APH を処理した卵抽出液から経時的に単離したクロマチン画分を用いて、western blotting により RecQL4 および Rpa30 を検出した。B. caffeine、geminin あるいはその両者を共存させた APH 処理卵抽出液よりクロマチン画分を単離し、western blotting により RecQL4 および Rpa30 を検出した。

RPA は DNA 複製開始に応じて一過的に DNA 複製開始部位に結合したのち速やかにクロマチンより解離するが、APH により DNA 複製に障害を与えた場合には、DNA 複製フォークに比較的長期間に渡って蓄積した (Fig.26A, Rpa30)。アフリカツメガエルの卵抽出液において APH による DNA 複製阻害によって、ATR 依存のチェックポイント機構が活性化されることはすでに報告されている (Kumagai et al., 1998)。さらに、RPA が ATR と相互作用する ATR interacting protein (ATRIP) の足場として機能することが知られるため (Zou and Stephen, 2003)、この RPA の蓄積によってチェックポイント機構が十分に活性化されることが考えられる。この条件において RecQL4 のクロマチン画分への顕著な移行が観察された (Fig.26A, “APH”)。このことは RecQL4 が複製フォークの安定化あるいは再開に何らかの積極的な役割を果たしていることを意味しているものと考えられる。

次に、caffeine を添加した条件で APH 存在化に反応させた卵抽出液よりクロマチン画分を単離し、RecQL4 および Rpa30 を検出した (Fig.26B, “caff”)。caffeine は、チェックポイント機構の起点となる ATM、ATR を阻害し、チェックポイント機構を抑制することが可能である (Sarkaria et al., 1999; Zhou et al., 2000)。このときの RecQL4 および Rpa30 のクロマチン画分への移行は、caffeine を加えていない場合と比較して、顕著に増加していた。S 期の初期に活性化される複製開始点の発火の直後に DNA 複製が停止することでチェックポイント機構が活性化され、これによって他の複製開始点の発火が抑止されることが知られる。したがって、caffeine によってチェックポイント機構が不活性化された場合には、複製開始点の発火が頻発したのち APH の DNA ポリメラーゼの阻害に起因して停止した DNA 複製フォークが増加すると推測される。このため、結果として RecQL4 および Rpa30 のクロマチンへの結合が亢進したと考えられる。ただし、この場合には caffeine の添加によりある程度の DNA 合成の亢進も引き起こされることが予想されるが、今回用いた APH の濃度においてそのような現象が認められないことは確認している (data not shown)。

さらに、geminin を添加した卵抽出液にさらに APH を添加した条件における RecQL4 のクロマチン結合について検討した (Fig.26B, “gem” and “gem+caff”)。geminin は、複製開始

に必要なタンパク質の一つである MCM 複合体のクロマチンへの結合を阻害するタンパク質であるが、このような条件における RecQL4 および Rpa30 のクロマチン画分への移行は観察されなかった。この結果より、APH によって誘発される RecQL4 のクロマチン結合は DNA 複製に依存していることが確認された。

## 第 8 節 RecQL4 免疫除去卵抽出液における

### DNA 複製再開後の DNA 複製速度の解析

APH によって誘発された RecQL4 のクロマチン結合の意義を解析する目的で restart assay (第 5 章 実験材料および方法参照) をおこなった。

解析を進めるために、抗血清を用いて RecQL4 をアフリカツメガエル卵抽出液から除去した。あらかじめ抗血清を protein A-Sepharose とインキュベートして得た抗体結合 protein A-Sepharose を卵抽出液に懸濁し、4°C で 1 時間攪拌した。こののち protein A-Sepharose を除き、得られた抽出液を RecQL4 免疫除去抽出液とした。抗 RecQL4 抗血清のかわりに免疫前血清を用いたものを mock 処理抽出液とし、対照として用いた。以後、この操作によって 95% 以上の RecQL4 が除去された卵抽出液を RecQL4 免疫除去卵抽出液とする。なお、本研究で解析している RecQL4 以外のタンパク質は、この操作により減少しないことを確認している (data not shown, Fig.25A 参照)。

得られた各卵抽出液に精子核 DNA および APH を添加し、23°C で 60 分間インキュベートしたのち、形成された細胞核 (APH-nuclei) を単離した。この APH-nuclei を APH を含まない卵抽出液に添加し、ここにおける DNA 複製活性を検討した (Fig.27A)。2 回目のインキュベートに用いる卵抽出液には、DNA 再ライセンス化を抑止する目的で geminin があらかじめ添加されており、2 回目のインキュベート時にクロマチン上に MCM 複合体が新たに結合することはない。また、restart assay のグラフの値は、mock→mock で得られた DNA 複製活性の値を 100% としたときの相対値で算出した。その結果、RecQL4 除去抽

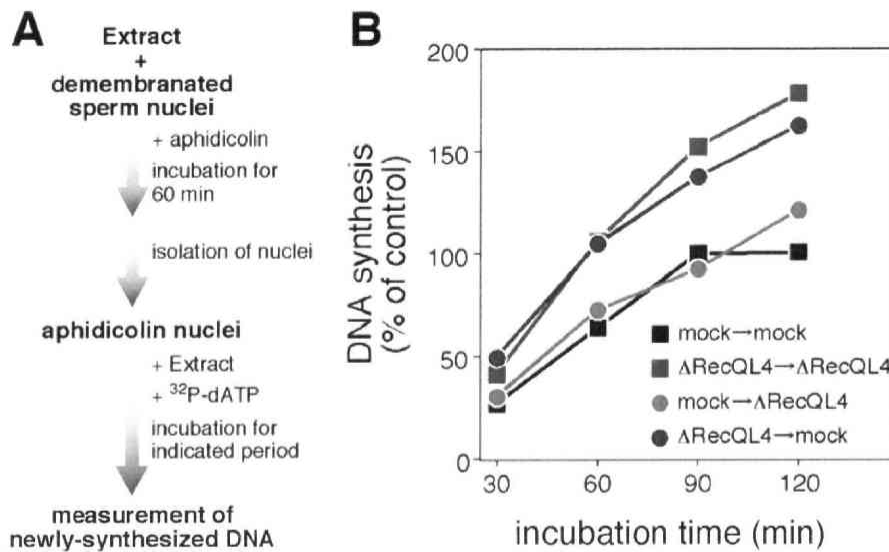


Fig.27 DNA 複製の再開後の合成速度の変化。A. 実験の概略。B. APH により停止した DNA 複製を再開させた際の DNA 合成速度について、RecQL4 免疫除去抽出液 ( $\Delta$ RecQL4) および mock 処理抽出液 (mock) を用いて検討した。

出液では mock 処理抽出液と比較して DNA 複製速度の亢進が観察された (Fig.27B, “mock→mock” and “ $\Delta$ RecQL4→ $\Delta$ RecQL4”)。これより、RecQL4 は APH によって停止した DNA 複製フォークの再開において何らかの機能を果たしていることが示唆された。

次に、上記で観察された DNA 複製速度の亢進が DNA 複製フォークが停止した段階における RecQL4 の機能に起因するのか、DNA 複製の再開後の DNA 合成における RecQL4 の機能に起因するのかを検討するため、2 回目のインキュベートに用いる各卵抽出液を入れ替えて同様の実験をおこなった (Fig.27B, “mock→ $\Delta$ RecQL4” and “ $\Delta$ RecQL4→mock”)。その結果、2 回目のインキュベートに用いる抽出液の種類に関わらず、1 回目のインキュベートに RecQL4 免疫除去卵抽出液を用いた場合においてのみ DNA 複製速度の亢進が観察された。これより、DNA 複製フォークが停止した際に機能する RecQL4 が、DNA 複製を正常に再開させるために重要であることが示唆された。

restart assay において 2 回目のインキュベートを未処理の卵抽出液を用いておこなった場合にも、免疫除去処理卵抽出液を用いて 2 回目のインキュベートをおこなった場合の DNA 複製活性と顕著な違いは観察されなかった (Fig.28 以下の結果を参照)。したがって、以後は 1 回目のインキュベート時に用いた各卵抽出液の名称のみを表記することとする。

## 第9節 チェックポイント機構の障害による

### DNA 複製再開後の DNA 複製速度への影響

アフリカツメガエルの卵抽出液において、APH による DNA 複製阻害によって、ATR 依存のチェックポイント機構が活性化されることが報告されている (Kumagai et al., 1998)。このとき活性化されるチェックポイント機構は、DNA 複製フォークが何らかの障害に遭遇した際に、その障害を修復するために細胞周期を停止させておくとともに、DNA 複製装置をフォーク上に維持する役割を担う可能性も指摘されている。そこで、APH によって誘発された DNA 複製チェックポイント機構 (ATR 依存的なチェックポイント機構) に、RecQL4 が何らかの関与を示す可能性を考え、caffeine を添加した卵抽出液に APH を作用させた条件で単離したクロマチンを用いて restart assay をおこなった (Fig.28)。

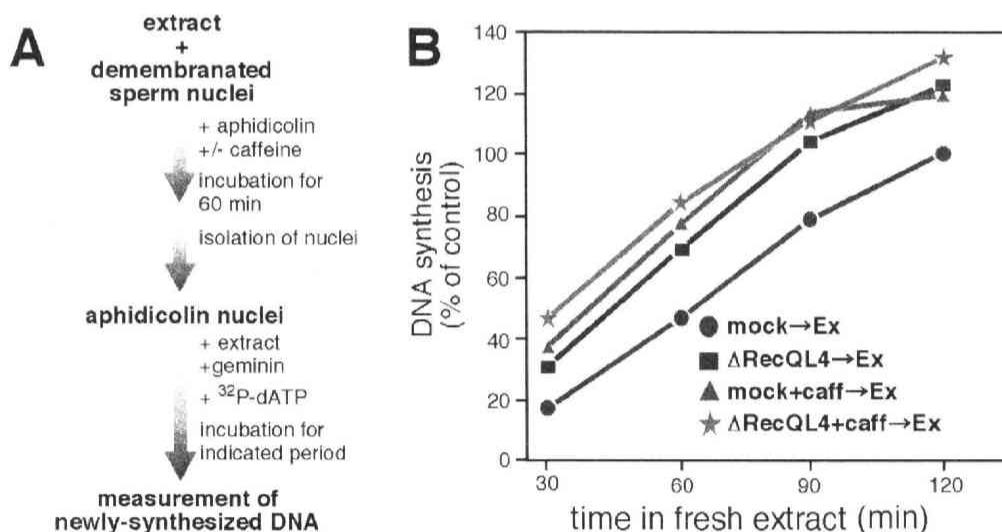


Fig.28 DNA 複製再開後の DNA 合成速度に対する caffeine の影響。A. 実験の概略。B. APH により停止した DNA 複製を再開させた際の DNA 合成速度に対する caffeine の影響について、RecQL4 免疫除去抽出液 (ΔRecQL4) および mock 処理抽出液 (mock) を用いて検討した。

解析を進めるために、抗血清を用いて RecQL4 をアフリカツメガエル卵抽出液から除去した。また、抗 RecQL4 抗血清のかわりに免疫前血清を用いたものを mock 処理抽出液とし、対照として用いた。得られた各卵抽出液に APH と精子核 DNA を添加し、さらに、チェックポイント機構を障害する caffeine を実験の条件に応じて添加後、23°C で 60 分間



インキュベートしたものからクロマチン画分を単離した。単離したクロマチン画分を新しい卵抽出液に添加し、DNA 複製活性を測定した (Fig.28A)。その結果、caffeine を添加した mock 処理卵抽出液では、RecQL4 免疫除去卵抽出液で観察されるのと同様の DNA 複製速度が観察された (Fig.28B, “mock+caff→Ex” and “ΔRecQL4→Ex”)。さらに、驚くべきことに、caffeine を添加した RecQL4 免疫除去卵抽出液の DNA 複製速度は、RecQL4 免疫除去卵抽出液の DNA 複製速度よりもさらに亢進することが予想されたが、実際には RecQL4 免疫除去卵抽出液や caffeine を添加した mock 処理卵抽出液と同等であった (Fig.28B, “ΔRecQL4→Ex” and “ΔRecQL4+caff→Ex”)。以上の結果より、RecQL4 は DNA 複製チェックポイント機構の活性化に関与しているか、あるいは、DNA 複製チェックポイント機構が引き起こす未発火の複製開始点の抑制や複製フォーク上の DNA 複製装置の維持に寄与している、という可能性が考えられた。ここで示唆された可能性について以下の実験をおこなうことによりさらに検討した。

## 第 10 節 RecQL4 免疫除去卵抽出液による Chk1 のリン酸化の変化

DNA 複製の進行の障害時において、ATR 依存的な Chk1 のリン酸化が起こり S 期チェックポイント機構が活性化することが報告されている (Zhou et al., 2002; Zhao et al., 2002)。もし、RecQL4 が S 期チェックポイント機構の活性化に関与しているのなら、RecQL4 免疫除去卵抽出液中において Chk1 のリン酸化は検出されないはずである。この可能性を検討するため以下の実験をおこなった。

解析を進めるために、抗血清を用いて RecQL4 をアフリカツメガエル卵抽出液から除去した (Fig.29A)。また、抗 RecQL4 抗血清のかわりに免疫前血清を用いたものを mock 処理抽出液とし、対照として用いた。得られた各卵抽出液に精子核 DNA を添加し、実験の条件に応じて APH または caffeine を添加後、23°C で 60 分間インキュベートし核画分を単離した。単離した核画分中のリン酸化型 Chk1 を抗リン酸化型 Chk1 抗体を用いて western



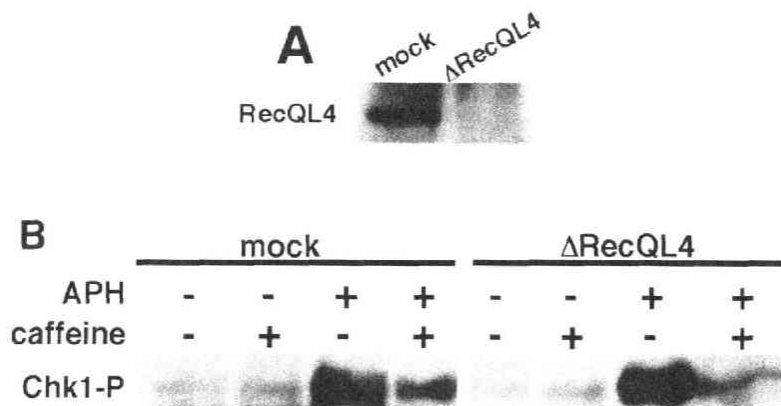


Fig.29 RecQL4 免疫除去抽出液における Chk1 のリン酸化。A. 各卵抽出液中の RecQL4 を western blotting により検討した。B. APH により誘起される Chk1 のリン酸化に対する RecQL4 免疫除去の効果 western blotting により検討した。

blotting により検出した (Fig.29B)。その結果、mock 処理卵抽出液において Chk1 のリン酸化が APH 依存的に起こり、さらに、このリン酸化が ATR/ATM の阻害剤である caffeine によって消失することが確認された (Fig.29B, “mock”)。このとき、RecQL4 免疫除去卵抽出液の Chk1 のリン酸化の挙動に、mock 処理卵抽出液と比較して顕著な違いは観察されなかった (Fig.29B “ $\Delta$ RecQL4”)。これより、RecQL4 は ATR-Chk1 依存的なチェックポイント機構の活性化に関与していないことが示唆された。

## 第 11 節 RecQL4 と DNA 複製開始点発火機構との関係

初期段階に発火した複製開始点の DNA 複製フォークの進行に障害が生じると、ATR-Chk1 依存的なチェックポイント機構が活性化され、最終的に CDK の阻害タンパク質である p21 が増加し、増加した p21 が未発火の複製開始点の発火を抑制することにより細胞周期を停止させることが知られている (第 2 章、第 9 節参照)。もし、RecQL4 が DNA 複製の進行の障害によって活性化されるチェックポイント機構によって誘発される未発火の複製開始点の発火の抑制に関与しているのなら、複製開始点の新たな活性化を抑制した条件下で DNA 複製を再開させ、DNA 複製活性を測定すれば RecQL4 の有無によって顕著

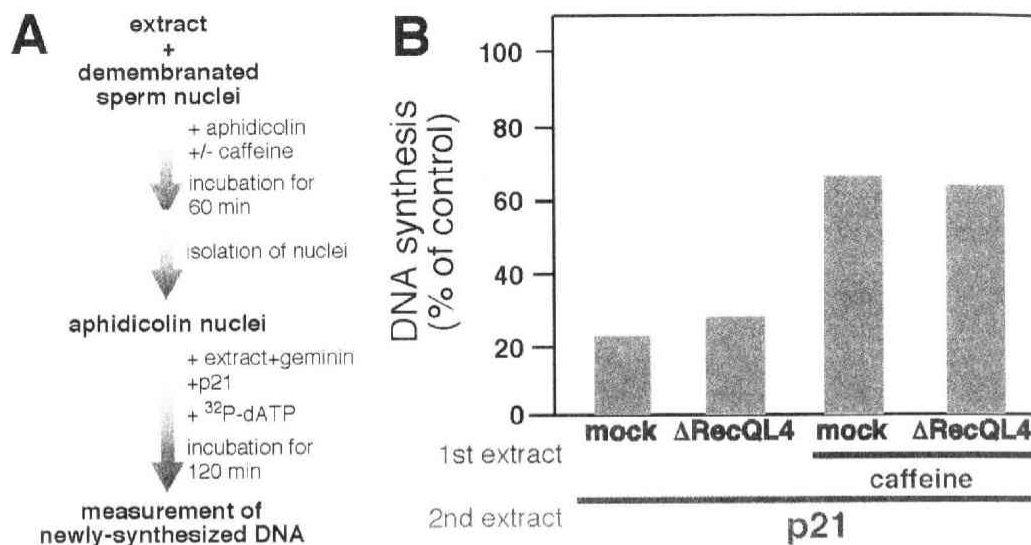


Fig.30 チェックポイント機構による複製開始点の抑制に対する RecQL4 免疫除去の効果。A. 実験の概略。B. p21 の共存により新たな複製開始点の活性化を抑制した条件下で、APH の作用の解除による DNA 複製の再開について検討した。

な DNA 複製活性の相違が観察されるはずである。したがって、この可能性を検討する目的で以下の実験をおこなった。

解析を進めるために、抗血清を用いて RecQL4 をアフリカツメガエル卵抽出液から除去した。また、抗 RecQL4 抗血清のかわりに免疫前血清を用いたものを mock 処理抽出液とし、対照として用いた。得られた各卵抽出液に精子核 DNA および APH を添加し、実験の条件に応じて caffeine を添加後、23°C で 60 分間インキュベートしたものからクロマチン画分を単離した。新たな複製開始点の発火を抑制する目的で添加した p21 を含む卵抽出液を単離したクロマチンと混合し、23°C でインキュベートし DNA 複製活性を測定した (Fig.30A)。その結果、mock 処理卵抽出液と RecQL4 免疫除去卵抽出液の DNA 複製活性に顕著な相違は観察されなかった (Fig.30B, “mock” and “ΔRecQL4”)。さらに、caffeine を処理した卵抽出液の DNA 複製活性が caffeine 未処理の卵抽出液の DNA 複製活性より有意に増加していたことから、この実験系において複製開始点の発火頻度の違いを的確に捉えていることが示唆された (Fig.30B, “mock+caffeine” and “ΔRecQL4+caffeine”)。これらの結果より、RecQL4 は DNA 複製の進行の障害時において新たな複製開始点の発火の調節機構には関与していないことが示唆された。

## 第 12 節 RecQL4 と DNA 複製装置維持機構との関係

最近、APH による DNA ポリメラーゼの阻害によって DNA 合成を抑制しても MCM 複合体のヘリカーゼ活性により DNA 合成に依存せず DNA 複製フォークの巻き戻しが持続することが示された (Byun et al., 2005)。もし、RecQL4 が DNA 複製の進行の障害時に MCM 複合体の機能の調節を介して DNA 複製装置の維持機構に関与しているならば、MCM 複合体の活性を抑制した条件下で DNA 複製を再開させ、DNA 複製活性を測定すれば RecQL4 の有無によって顕著な DNA 複製活性の相違が観察されるはずである。そこで、この可能性を検討する目的で以下の知見を考慮して組み換えタンパク質を作成した。

酵母の 2-ハイブリットスクリーニングと哺乳類細胞の抽出液を用いた免疫沈降の両方の結果から、retinoblastoma (Rb) タンパク質の N 末端 400 アミノ酸の領域 ( $Rb^{1-400}$ ) と Mcm7 の C 末端が相互作用することが観察された。さらに、アフリカツメガエル卵抽出液に組換え  $Rb^{1-400}$  タンパク質を添加すると内因性の Mcm7 の機能が阻害され、DNA 複製が抑制されることが示された (Stern et al., 1998)。また、Pacek らの卵抽出液無細胞実験系を用いた詳細な解析から、 $Rb^{1-400}$  は Mcm7 と相互作用することによって、MCM 複合体のクロマチンへの移行やクロマチン上の MCM 複合体の機能を阻害することが示された (Pacek et al., 2004)。これらのことより、2 回目のインキュベート時に  $Rb^{1-400}$  タンパク質を添加した卵抽出液を用いれば、MCM 複合体の活性を抑制した条件下で DNA 複製を再開させることが可能であり、示唆された可能性を検討するのに必要な知見が得られるのではないかと考え、ヒト  $Rb^{1-400}$  ( $hRb^{1-400}$ ) タンパク質を発現、精製した (第 5 章 実験材料および方法参照)。この組換えタンパク質を用いて以下の実験をおこなった。

解析を進めるために、抗血清を用いて RecQL4 をアフリカツメガエル卵抽出液から除去した。また、抗 RecQL4 抗血清のかわりに免疫前血清を用いたものを mock 処理抽出液と

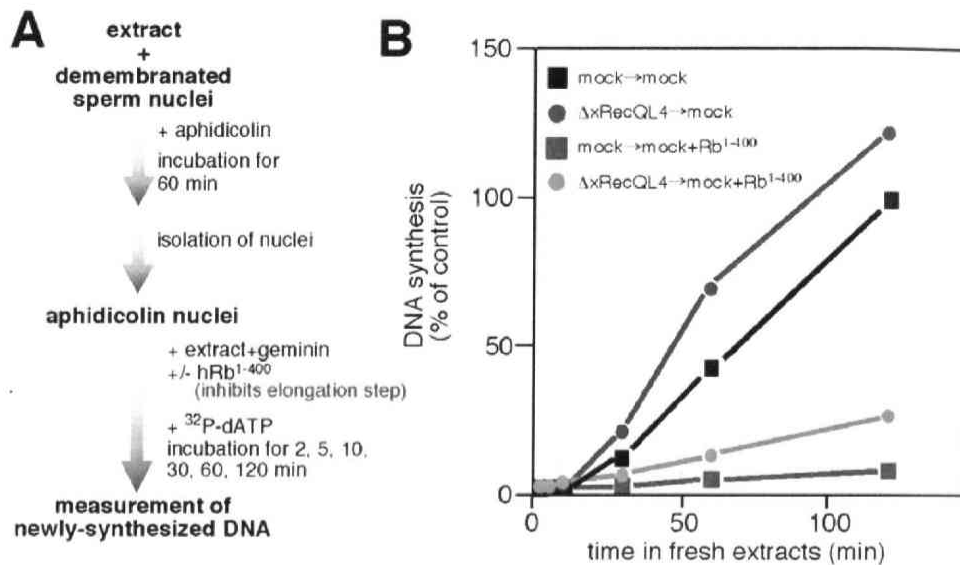


Fig.31 MCM 複合体の機能を抑制した条件下での DNA 複製の再開。A.実験の概略。B. hRb<sup>1-400</sup> により MCM 複合体の機能を抑制した条件下で、APH の作用を解除したあとの DNA 合成活性について検討した。

し、対照として用いた。得られた各卵抽出液に APH および精子核 DNA を添加し、23°C で 60 分間インキュベートしクロマチン画分を単離した。DNA 複製の再開後に機能する MCM 複合体のヘリカーゼ活性を抑制する目的で添加した hRb<sup>1-400</sup> を含む卵抽出液または対照となる緩衝液を添加した卵抽出液を単離したクロマチンと混合し、23°C でインキュベートしたときの DNA 複製活性を測定した (Fig.31A)。その結果、mock 処理卵抽出液では hRb<sup>1-400</sup> の添加より DNA 複製活性が抑制されたのに対し、hRb<sup>1-400</sup> を添加した RecQL4 免疫除去卵抽出液では若干の DNA 複製活性が観察された (Fig.31B, “mock → mock+Rb<sup>1-400</sup>” and “ΔRecQL4 → mock+Rb<sup>1-400</sup>”)。これより、RecQL4 が DNA 複製装置維持機構に関与している可能性が示唆された。

RecQL4 と DNA 複製装置維持機構との関係に関する更なる知見を得るために、APH によって誘発されるクロマチン結合タンパク質の挙動の変化を RecQL4 免疫除去卵抽出液を用いて観察した (Fig.32)。RecQL4 免疫除去卵抽出液または mock 処理卵抽出液に APH および精子核 DNA を添加し、23°C でインキュベートしたのち、経時的にクロマチン画分を単離した。単離したクロマチン画分のタンパク質は、抗 RecQL4 抗体、抗 Rpa30 抗体

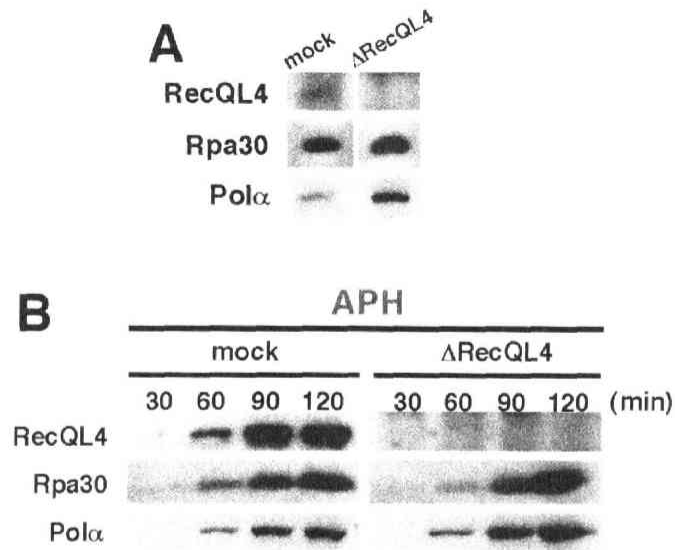


Fig.32 APH 処理時の Rpa30 および Polα の挙動に対する RecQL4 の影響。A. mock 処理抽出液 (mock) および RecQL4 免疫除去抽出液 (ΔRecQL4) 中の RecQL4、Rpa30 および Polα を western blotting により検出した。B. APH を添加した mock 処理抽出液 (mock) および RecQL4 免疫除去抽出液 (ΔRecQL4) 中での RecQL4、Rpa30 および Polα のクロマチン結合について western blotting により経時的に観察した。

および抗 DNA polymeraseα (Polα) 抗体を用いて western blotting により検出した。その結果、mock 処理卵抽出液の各タンパク質の挙動に、未処理の卵抽出液を用いた場合との顕著な違いは観察されなかった (Fig.32B, “mock”)。一方、RecQL4 免疫除去卵抽出液から単離したクロマチン画分に RecQL4 は観察されなかった (Fig.32B, “ΔRecQL4” RecQL4)。このとき、Rpa30 および Polα のクロマチン結合に、mock 処理卵抽出液と比較して僅かな増加が観察された (Fig.32B, “ΔRecQL4”)。この増加は、DNA 複製の進行の障害時における RecQL4 による MCM 複合体の調節が破綻したことにより、過剰な DNA 複製フォークの巻き戻しが誘発された結果であると考えられた。

以上より、DNA 複製フォークが何らかの障害に遭遇した際に、RecQL4 は MCM 複合体の機能を調節し、これにより正常な DNA 複製の再開のための DNA 複製装置の維持に寄与していることが示唆された。

## 第 4 章 考察

高等真核生物では、5 種類の RecQ 型ヘリカーゼの存在が知られている。これらをコードする遺伝子のうち、*BLM*、*WRN*、*RecQL4* は、それぞれブルーム症候群 (BS)、ウェルナー症候群 (WS)、ロスモンド-トムソン症候群 (RTS) の原因遺伝子である。

これらの遺伝病患者の細胞では共通して染色体異常を生じるが、それらの異常の特徴は各遺伝病によって異なる。BS 患者細胞では、高頻度の姉妹染色分体交換の他、四軸交換などの亢進も見られる。WS 患者細胞では、遺伝子の欠失や転座が亢進している。また、RTS 患者細胞では染色体の倍数体化が頻発することが知られている。このことから、各 RecQ ファミリータンパク質は染色体の安定化や分配、DNA 修復の異なる場面でそれぞれの機能を果たしていることが示唆されている。本研究では、これら 3 種の RecQ ファミリータンパク質の中で特に解析が遅れている *RecQL4* の DNA 複製・修復への関与を検討した。

### DNA 二本鎖切断修復における *RecQL4* の機能

本研究によって、*RecQL4* が DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復機構で機能することが「DSB によって DNA 複製に依存しない *RecQL4* のクロマチン結合が誘発される」、「DSB によって誘発された *RecQL4* のクロマチン結合は RPA に依存する」という結果より示唆された。これらの結果は、DSB によって誘発される *RecQL4* のクロマチンへの結合が、DNA 複製中に誘発される *RecQL4* のクロマチン結合とは異なる機構で誘起されていることを示唆する。さらに、RPA は DSB の生成に際して、DSB の認識よりもむしろ修復経路の初期の段階に機能すると考えられるため、DSB によって誘発される *RecQL4* のクロマチン結合が RPA に依存することは、*RecQL4* が DSB 修復で機能していることを示唆している。この可能性は、*RecQL4* 免疫除去卵抽出液における  $\gamma$ H2AX の消失の遅延が初期段階で顕著で

あった結果からも窺える (Fig.25B)。

現在までに、DSB 修復機構は Rad51 依存的な相同組み換え修復機構 (HRR; homologous recombination repair) と、Ku70/80 複合体と DNA-Pkcs に依存した非相同 DNA 末端結合修復 (NHEJ; non-homologous end-joining repair) の2種類の機構が存在すると考えられている。本研究で用いた条件においても、*EcoRI* を添加した卵抽出液中のクロマチン上に Rad51 および Ku70 が結合することが観察された。

### HRR と RecQL4 の関係について

DSB によって誘発された RecQL4 のクロマチン結合が、HRR において必須な機能を担う RPA に依存していることが示唆されたことから (Fig.17B)、RecQL4 は HRR に関与している可能性が考えられた。さらに近年、ヒト培養細胞を用いた最近の研究において、エトポシドによって誘発された DNA 傷害時に RecQL4 と Rad51 が共局在することが示された (Petvoic et al., 2005)。そこで、DNA 傷害によって誘発される Rad51 の核局在形成能を抑制することが HeLa 細胞において示された組換え hBRC4 (GST-hBRC4) を用いて、RecQL4 のクロマチン結合に対する影響を検討した。その結果、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系においても GST-hBRC4 は Rad51 のクロマチン結合を抑制したが、RecQL4 のクロマチン結合に対する影響は観察されなかった (Fig.20)。さらに、ChIP 法による解析より、DSB に応じてクロマチンに結合した RecQL4 の近傍に Rad51 が結合していないことが示唆された (Fig.23)。これらの結果より、RecQL4 は「HRR において RPA の下流から Rad51 の上流の間で機能する」、もしくは、「Rad51 に依存しない DSB 修復経路で機能する」ことが示唆された。

さらに、ヒト培養細胞の抽出液を用いた免疫沈降によって RecQL4 と Rad51 が相互作用することが示されているが (Petvoic et al., 2005)、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた場合には、RecQL4 と Rad51 の相互作用は観察されなかった (Fig.24)。これらの結果の相



反は、ヒトとカエルの生物種の違いや、胚細胞と体細胞の細胞種の違いに起因しているのかもしれない。もしくは、*Xenopus* RecQL4 が HRR のみならず、他の DSB 修復経路にも関与しており、切断された DNA の構造や細胞周期の状態などによって使い分けられている可能性も考えられる。すなわち、本研究においてとくに注目している RecQL4 のクロマチン結合が、HRR とは異なる経路に関わるものであるということなのかもしれない。RecQL4 免疫除去卵抽出液における $\gamma$ H2AX の消失の遅延が DSB 修復の初期段階で顕著に観察されたのに対して、RecQL4 のクロマチン結合が Ku 複合体のクロマチンからの解離のあとで顕著に観察されることから、RecQL4 が DSB 修復において複数の役割を果たすことを推測できる (Fig.25B)。

## NHEJ と RecQL4 の関係について

DSB によって誘発された RecQL4 のクロマチン結合は、wortmannin の処理によって減少し、その効果は caffeine 処理の効果よりも顕著であった (Fig.21B, “lane 7-9”)。

この実験結果では DSB に応じた Rpa30 のバンドシフトも認められる。このバンドシフトは caffeine の処理によっても影響を受けないが、wortmannin によってほぼ完全に抑止された。HeLa 細胞で発現している RPA の second subunit (*Xenopus* Rpa30 に相当) でも DSB 誘発時に同様のバンドシフトが確認されており、このバンドシフトが RPA の second subunit の hyperphosphorylation に起因することが示されている。さらに、この hyperphosphorylation には、DNA-PK の活性が必須であるが、ATM の機能は必須ではないことも報告されている (Wang et al., 2001)。したがって、この実験系においても、wortmannin は DNA-Pkcs を効率よく阻害し、caffeine は DNA-PK 活性にほとんど影響を与えていないと考えられる。

一方、DSB の誘発による DNA 複製の抑制は、caffeine 感受性のチェックポイント機構に依存すること (Kobayashi et al., 2002)、DNA の断端を持つ直線状のプラスミドの添加によって、ATM 依存的なチェックポイント機構が活性化されること (Costanzo et al. 2000) が、



アフリカツメガエル卵抽出液を用いた同様の実験系でこれまでに示されている。したがって、caffeine、wortmannin の両者ともに DSB で誘発される DNA 複製の抑制を効率よく解除したことより (Fig.21A, “*EcoRI*”), 今回の実験の条件下でも caffeine および wortmannin が ATM を効率よく阻害していることが確認された。

すなわち、上記の caffeine および wortmannin による効果に違いは、DSB に応じた RecQL4 のクロマチン結合が DNA-PK の機能と ATM 依存的なチェックポイント機構の両者に依存することを示唆している。さらに、DSB によって誘発される RecQL4 のクロマチン結合が wortmannin の処理によっても完全には阻害されないため、DSB によって活性化される ATM または DNA-PK の機能は RecQL4 のクロマチン結合に必須ではないと推測される。これより、RecQL4 は DSB 誘発時にクロマチンに弱く結合したのち、ATM または DNA-PK の機能によって安定にクロマチン上に維持されるようになるという可能性が考えられる。

本研究の ChIP 法を用いた実験結果から、Ku70 と RecQL4 が共沈降することが確認された (Fig.23)。この結果より、RecQL4 が DSB 部位に結合した Ku70/80 複合体のごく近傍に結合しているか、DSB 誘発時に Ku70/80 複合体と相互作用することが示唆された。一方、RPA 非存在下または wortmannin 処理時には、DSB により誘起される RecQL4 のクロマチン結合が消失または減少したが、このときの Ku70 のクロマチン結合に顕著な変化は観察されなかった (Fig.17B and 21B)。また、RecQL4 免疫除去卵抽出液における Ku70 の挙動は、mock 処理卵抽出液の挙動と比較して顕著な変化は観察されなかった (Fig.25B)。これらの結果より、RecQL4 が Ku70/80 複合体の下流で機能していることが示唆された。

以上の結果は、RecQL4 が DSB 修復機構、とくに NHEJ において機能することを示唆するものであると同時に、RecQL4 が複数の修復経路にまたがって DSB 修復に関与する可能性を提示していると考えられる。したがって、RecQL4 は DSB 修復において重要な役割を担うことでゲノム安定性維持機構に積極的に関与すると推測された。

## DNA 複製の障害に対する RecQL4 の機能

### DNA 複製の障害に対する応答反応への RecQL4 の関与

APH は、DNA 複製に関与する DNA ポリメラーゼを阻害する DNA 複製阻害剤である。したがって、APH の処理によって DNA 複製フォークの進行が障害を受ける。RecQ ファミリーDNA ヘリカーゼのひとつ BLM は、このような DNA 複製停止からの回復に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、同様の機能が RecQL4 にも存在するかを確かめるため、DNA 複製フォークの進行の障害からの回復過程における RecQL4 の寄与を検討した。

まず、DNA 複製フォークの停止によって RecQL4 の挙動が変化するか否かを検討したところ、APH の共存によって RecQL4 のクロマチン画分への蓄積が観察された (Fig.26A, “APH”)。

APH の処理によりチェックポイント機構が活性化することが知られているため、caffeine を添加することでチェックポイント機構を阻害し、この条件における RecQL4 の挙動について検討した。その結果、APH 処理により引き起こされた RecQL4 の蓄積は、caffeine 共存下においてさらに増加した (Fig.26B, “caff”)。これより、APH によって誘発される RecQL4 のクロマチン結合は、DNA 複製フォークの停止により活性化されるチェックポイント機構により抑制を受けることが示唆された。

APH 処理による RecQL4 のクロマチンへの結合が、DNA 複製依存的であることを確認するために、卵抽出液に DNA 複製の内因性阻害タンパク質である geminin を添加した。卵抽出液に geminin を添加すると、DNA 複製開始に必要な MCM タンパク質複合体のクロマチンへの結合が阻害されるため DNA 複製を開始することができなくなる (McGarry and Kirschner, 1998; Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000)。この条件下で、APH によって誘発される RecQL4 のクロマチン結合が消失したことから (Fig.26B, “gem” and “gem+caff”), APH の処理に応じた RecQL4 のクロマチン結合が DNA 複製に依存している

ことが確認された。

これらの結果より、DNA 複製フォークが何らかの障害に遭遇した際に RecQL4 が機能することが示唆された。

### DNA 複製フォーク停止からの回復における RecQL4 の機能

APH によって誘発された RecQL4 のクロマチン結合の意義を解析する目的で、RecQL4 免疫除去卵抽出液を用いて APH による DNA 複製フォークの進行の障害からの回復過程における DNA 合成量の経時的変化を検討した。その結果、RecQL4 非存在時には、DNA 複製の再開に際して DNA 複製速度の亢進が観察された (Fig.27B, “ $\Delta$ RecQL4 $\rightarrow\Delta$ RecQL4”)。すなわち、RecQL4 が DNA 複製フォークの進行の障害からの回復過程において何らかの機能を果たしていることが示唆された。さらに、この DNA 複製速度の亢進が、DNA 複製フォークが停止した際の RecQL4 の機能の欠損に由来するのか、あるいは DNA 複製停止からの回復時における RecQL4 の機能の欠損に由来するのかを検討した。その結果、DNA 複製停止から回復させる際に用いる卵抽出液での RecQL4 の有無に関わらず、APH 処理した RecQL4 免疫除去卵抽出液から単離したクロマチンを用いた場合に DNA 複製速度の亢進が観察された (Fig.27B, “ $\Delta$ RecQL4 $\rightarrow$ mock”)。これらの結果より、DNA 複製フォークの進行の障害に際して、RecQL4 は停止した DNA 複製フォーク上の複製装置を正常に維持する働きをもつ、という可能性が考えられた。

アフリカツメガエルの卵抽出液において APH による DNA 複製阻害によって、ATR 依存性のチェックポイント機構が活性化されることが報告されている (Kumagai et al., 1998)。そこで、ATR を阻害する caffeine による DNA 複製の再開への影響について検討した。その結果、RecQL4 非存在時に観察された DNA 複製速度の亢進と同様の現象が、caffeine を添加した卵抽出液でも観察された (Fig.28B, “mock+caff $\rightarrow$ Ex”)。

一方、RecQL4 免疫除去卵抽出液で観察された DNA 複製の再開における DNA 複製の亢進は、caffeine の添加によっても亢進されなかった (Fig.28B, “ $\Delta$ RecQL4+caff $\rightarrow$ Ex”)。以上

の結果より、RecQL4 は DNA 複製チェックポイント機構の活性化に関与しているか、あるいは、DNA 複製チェックポイント機構が引き起こす何らかの現象に必須である、と考えられた。DNA 複製フォークの進行の障害に伴いに活性化されるチェックポイント機構は停止したフォーク上における DNA 複製装置の維持と密接な関連があることが予想されている。すなわち、以上の結果は RecQL4 が停止した DNA 複製フォーク上の複製装置を正常に維持する働きをもつ、という仮説に矛盾しない。

そこで、RecQL4 が DNA 複製チェックポイント機構の活性化に関与している可能性を検討する目的から、その活性化の指標となる Chk1 のリン酸化について RecQL4 免疫除去卵抽出液を用いて検討した。その結果、核内のリン酸化型 Chk1 の量に、RecQL4 の有無による顕著な変化は観察されなかった (Fig.29B)。これより、RecQL4 が APH によって誘発される DNA 複製チェックポイント機構の活性化には関与していないことが示唆された。

APH 処理によって誘起される DNA 複製チェックポイント機構が、未発火の複製開始点の活性化を抑制することが知られている。そこで、この抑制に RecQL4 が関与している可能性について次に検討した。複製開始点の活性化に必須な CDK 活性を阻害する p21 によって未発火の複製開始点の活性化を抑制した条件下で、APH 処理後に単離した核における DNA 複製活性を測定した。その結果、caffeine による APH 処理卵抽出液中の複製開始点活性化の亢進が認められたが、RecQL4 の有無に起因する顕著な変化は観察されなかった (Fig.30B)。これより、DNA 複製チェックポイント機構による複製開始点活性化の抑制に RecQL4 は関与していないことが示唆された。

最後に、RecQL4 が DNA 複製フォーク上の DNA 複製装置の維持に関与している可能性について検討した。まず、RecQL4 と DNA 複製装置を構成するタンパク質との関係を確認するために、APH 処理時の Rpa30 および Pol $\alpha$  のクロマチン結合を観察した。その結果、RecQL4 免疫除去卵抽出液における Rpa30 および Pol $\alpha$  のクロマチン結合は、mock 処理卵抽出液と比較して若干増加していた (Fig 32)。最近、APH による DNA ポリメラーゼ阻害によって DNA 合成を抑制しても MCM 複合体のヘリカーゼ活性により DNA 複製フ

フォークの巻き戻しが持続することが示された (Byun et al., 2005)。今回の結果と以前の知見より、APH 処理時に RecQL4 が MCM 複合体の機能を調節することで DNA 複製フォークの過剰な巻き戻しを抑制し、正常な DNA 複製の再開を補助している可能性が考えられた。そこで、クロマチン上に結合した MCM 複合体の機能を阻害するヒト Rb タンパク質の N 末側断片 (hRb<sup>1-400</sup>) を組換えタンパク質として作成し、RecQL4 の有無による作用の違いについて検討した。その結果、mock 処理卵抽出液では hRb<sup>1-400</sup> を添加することにより DNA 複製活性がほぼ完全に抑制されたのに対し、hRb<sup>1-400</sup> を添加した RecQL4 免疫除去卵抽出液では若干の DNA 複製活性が観察された (Fig.31B, “mock→mock+Rb<sup>1-400</sup>”, “ΔRecQL4→mock+Rb<sup>1-400</sup>”)。

したがって、DNA 複製フォークが何らかの障害に遭遇した際に、RecQL4 は MCM 複合体の機能を調節し、これにより正常な DNA 複製の再開のための DNA 複製装置の維持に寄与していることが示唆された。

## 第 5 章 実験材料および方法

### 第 1 節 実験材料

#### アフリカツメガエル

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の雌を卵採取用として使用した。また、雄は精子核 DNA を採取する目的で使用した。

#### 抗体

1. anti-xRecQL4 antibody は、当研究室で作製されたものを使用した (董修論)。
2. anti-xRpa30 antibody は、山口大学大学院理学研究科 室伏博士より恵与された。
3. anti-xRpa70 antibody は、山口大学大学院理学研究科 室伏博士より恵与された。
4. anti-xRad51 antibody は、大阪大学微生物病研究所 前嶋博士より恵与された。
5. anti-xWRN antibody は、大阪大学 生命機能研究科 和賀博士より恵与された。
6. anti-xMcm6 antibody は当研究室で作成されたものを使用した。
7. anti-hγH2AX antibody は、Upstate より購入した。

8. anti-hH3 antibody は、Upstate より購入した。

9. anti-hKu70 antibody は、Neomaker より購入した。

10. anti-phosphorylated hChk1 Ser345 antibody は、Cell Signaling より購入した。

## 第 2 節 組み換えタンパク質の発現と精製

### 2.1 hBRCA2 の BRC4

293E 細胞から得られた cDNA を鋳型とし、4 本のプライマー (hBRC4-F; 5'-GAAAGTGT CCCAGTTGGTACTGGAAATCAAC-3', hBRC4-R; 5'-CTGCATTTCTTTACACTTTGGGGC AGC-3', EhBRC4-F; 5'-CCTTCCAGGGAGGATCCGAACGTGATG-3', EhBRC4-R; 5'-GATC TCGAGGGTCTCTCTCATGCTAATTC-3') を用いて PCR をおこない、hBRCA2 の BRC4 ドメインを増幅した。増幅された産物は反応系に dATP、rTaq DNA ポリメラーゼ (Takara) を加えることにより 3' 末端にアデニンを付加した後に Ligation Kit ver. 2 (Takara) を用いて pGEM T-easy vector (Promega) に挿入した。DNA 配列は BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (ABI) をもちいて、ABI PRISM 310 genetic Analyzer (ABI) により決定した。得られた挿入部位を *Bam*HI、*Xho*I で切り出したのち、挿入部位と *Bam*HI、*Xho*I によって切断された pGEX4T-3 (Amersham Pharmacia) を混合し、Ligation Kit ver. 2 を用いて両者を連結した。得られたプラスミドにより大腸菌 (BL21 (DE3) codon plus) (STRATAGENE) を形質転換し、タンパク質を発現させた。発現した可溶性タンパク質は、Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) を用いて精製した。これにより得られた hBRCA2-BRC4 タンパク質を実験に使用した。

## 2.2 hRb の N 末端 400 アミノ酸

293E 細胞から得られた cDNA を鋳型とし、2 本のプライマー (hRb1-400-F1; 5'-GAAAGGATCCATGCCGCCCCAAAACCCCCCG-3'、hRb1-400-R1; 5'-AATACTCGAGCAGATTTTCTGAAGGTTGATCACTTGCAG-3') を用いて PCR をおこない、hRb の N 末端側 400 アミノ酸に相当する領域を増幅した。増幅された産物は、反応系に dATP と rTaq DNA ポリメラーゼ (Takara) を加えることにより 3' 末端にアデニンを付加した後に Ligation Kit ver. 2 (Takara) を用いて pGEM T-easy vector (Promega) に挿入した。DNA 配列は BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (ABI) をもちいて、ABI PRISM 310 genetic Analyzer (ABI) により決定した。得られたプラスミドの挿入部位を *Bam*HI、*Xho*I で切り出したのち、*Bam*HI、*Xho*I によって切断された pGEX4T-3 を混合し、Ligation Kit ver. 2 を用いて両者を連結した。得られたプラスミドにより大腸菌 (BL21 (DE3) pLysS) を形質転換し、タンパク質を発現した。発現した可溶性タンパク質は、Glutathion-Sepharose 4B を用いて精製した。これにより得られた組換えタンパク質 (hRb<sup>1-400</sup>) を実験に使用した。

## 2.3 Geminin

Geminin は当研究室で作成されたものを使用した (渡辺修論)。

## 2.4 p21

p21 は当研究室で作成されたものを使用した (青木卒論)。

# 第 3 節 タンパク質の挙動の解析

## 3.1 western blotting

検体を SDS-PAGE に展開した後、転写用 buffer を満たした水槽型の転写装置を用いて



ポリアクリルアミドゲル中に泳動されたタンパク質を PVDF フィルター (HyBond-P, Amersham) に電氣的に転写した。PVDF フィルターへの転写は 30 V の電圧をかけて 10 時間以上をかけておこなった。通常、検体は pre-stained molecular weight marker (Bio-Rad) と共に電気泳動し、電気泳動ゲル中の分子量と移動度の関係について確認した。転写後のフィルターを 1% skim milk, Tween 20/PBS に浸して 1 時間振盪後、Tween 20/PBS で洗浄してから 1% BSA, Tween 20/PBS 中で抗血清と室温下、1 時間、振盪しながら反応させた。この PVDF フィルターを Tween 20/PBS で良く洗浄した後、同緩衝液で 2,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ (HRP) 融合型抗 rabbit IgG 抗体、抗 mouse IgG 抗体または Protein A (Amersham) と室温下、1 時間、振盪しながら反応させた。反応後、さらに Tween 20/PBS でよくフィルターを洗浄し、ECL kit (Amersham) を用いて化学発光させ、X 線フィルムを用いてこれを検出した。

1. 転写用 buffer

0.24% Tris、11.5% glycine、0.08% SDS、20% methanol

2. Tween 20 /PBS

137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.04 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、  
0.05% Tween 20

## 第 4 節 アフリカツメガエル卵抽出液を用いた解析

### 4.1 アフリカツメガエル卵抽出液の調製

アフリカツメガエルの産卵を誘導するため、採卵する 1 週間前に 50 U/匹の PMS (血清性性腺刺激ホルモン [濾胞刺激ホルモン: FSH]) (日本全薬工業株式会社) を皮下投与した。採卵前日に 500 U/匹のコリホルモン (胎盤性性腺刺激ホルモン) (日本全薬工業株式会社) を皮下投与し、一匹あたり 2 L の modified high salt barth (MHSB) 中で飼育した。採卵後、良質と思われる卵を選び、システインバッファーを用いて寒天質を除去した。その後、high salt barth (HSB) および冷却した UEB を用いてそれぞれ 3 回ずつ洗浄した。洗浄後、卵を

15 mL 遠心管に移し、3000 rpm, 4 °C, 1 分間遠心した。上清及び表面の白い卵を除き、再び 10,000 rpm, 4 °C, 10 分間遠心した。遠心後、中央部のクリーム色～黒褐色の層だけを超遠心用チューブに回収し、最終濃度 10 µg/mL のサイトカラシン B と 15%容量の EDB-S を加えて良く混和した。これを 30,000 rpm、20 分間、4 °C で超遠心機を用いて遠心し、中央の透明の層のみを回収した。回収した卵抽出液を 30 µm のメッシュサイズのナイロンメンブレンで濾過し、1/100 容量のグリセロールを加えて混和した。その後、抽出液を 20 µl ずつ液体窒素中に滴下して凍結した後、液体窒素保存容器中で保存した。

1. MHSB

110 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl pH7.6, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>

2. システインバッファー

2% cystein, 1 mM EGTA, NaOH で pH7.5 に調製

3. HSB

110 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>,  
2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

4. UEB

50 mM KCl, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA,  
2 mM 2-mercaptoethanol (2-ME)

5. EDB-S

50 mM KCl, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>,  
0.4mM EGTA, 10% sucrose, 10 µg/mL pepstatin A, 10 µg/mL leupeptin

6. サイトカラシン B

10 mg/mL になるように DMSO に溶解し、-20 °C で保存

7. EB

50 mM KCl, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM 2-ME

### 4.3 アフリカツメガエル精子核 DNA の調製

アフリカツメガエルのオスから精巣を摘出した。摘出した精巣を EB の入った培養皿に入れ、血管や脂肪組織を取り除いてから新しい EB の入った培養皿に移した。精巣を細かくきざんだ後、ホモジナイザーに移し、10-15 回ホモジナイズした。得られたホモジネイトを 25 $\mu$ m のナイロンメンブレンで濾過し、濾液を 2,500 rpm、4°C で 5 分間遠心した。得られた沈降画分を室温の SuNaSp で懸濁した。得られた懸濁液に終濃度 100  $\mu$ g/mL のリゾレクチンを加え、室温で 5 分間放置することにより脱膜をおこなった。脱膜が十分に進行しているかについてはヘキスト 33258 による DNA の蛍光染色と位相差顕微鏡観察により確認した。95%以上の核が脱膜されていることを確認したのち遠心し、沈降画分を 3% BSA, SuNaSp 2 mL で懸濁することで脱膜の反応を停止した。再度遠心し、沈降画分を 30% glycerol/EB に懸濁した。一部を取り、EB で希釈したのち、1  $\mu$ L あたりの精子核 DNA の数を顕微鏡下で数えた。終濃度  $1-2 \times 10^5$  精子核/ $\mu$ L となるように調整し、-80°C で保存した。

#### 1. EB

50 mM KCl、50 mM HEPES-KOH pH7.6、5 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM 2-ME

#### 2. SuNaSp

0.25 M sucrose、75 mM NaCl、0.5 mM spermidine、0.15 mM spermine

#### 3. リゾレクチン

2 mg/mL になるようにイオン交換水に溶解し、-20°C で保存

#### 4. ヘキスト 33324

2 mg/mL になるようにイオン交換水に溶解し、-20°C で保存。2,000 倍に希釈して使用。

### 4.4 卵抽出液反応系における DNA 合成量の測定

卵抽出液に 1/40 容量の e.r. および CHX、1.85 kBq/ $\mu$ L の [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP を添加し、精子核 DNA を 3 ng/ $\mu$ L extract となるように添加したのち、23°C で 90 分間から 180 分間インキュベートすることで DNA 複製反応を進行させた。その後、0.2 mg/mL proteinase K を含む stop C solution を加えて反応を停止し、よく混合してから 37°C で 30 分間以上インキュベートした。インキュベート後、10% TCA solution を加えさらに 4°C で 30 分間以上置くことで酸不溶性画分を沈降させた。この沈降物を 25 mm GF/C disc (Whatman) を用いて捕集し、5% TCA solution、ethanol で GF/C disc を洗浄後、乾燥させた。乾燥した GF/C disc をイオン交換水に浸し、捕集された放射活性をチェレンコフ法により測定した。

1. e.r.

1 M phosphocreatin、0.6 mg/mL creatin phosphokinase

2. CHX

10 mg/mL cycloheximide

3. stop C solution

20 mM Tris-HCl pH7.5、5 mM EDTA、0.5% SDS

4. 10% TCA solution

10% TCA、2% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O

#### 4.5 卵抽出液反応系からのクロマチン画分の単離

DNA 合成量の測定の場合と同様に卵抽出液中に、e.r.、CHX、精子核 DNA を添加しインキュベートした後、TNIB 中に懸濁した。15% sucrose/TNIB を下層に敷き、10,000 rpm、5 分間、4°C で遠心した。遠心後、最下部の層を残してそれ以外を取り除き、さらに TNIB を加えて混和し、14,000 rpm、5 分間、4°C で遠心した。その後、上清を取り除き、沈降画分をクロマチン画分とした。

1. e.r.

1 M phosphocreatin, 0.6 mg/mL creatin phosphokinase

2. CHX

10 mg/mL cycloheximide

3. TNIB

50 mM KCl, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 2 mM DTT, 0.5 mM

spermidine, 0.15 mM spermine, 1  $\mu$ g/mL pepstatin A, 1  $\mu$ g/mL

leupeptin, 0.1% TritonX-100

#### 4.6 免疫除去抽出液の調製

protein A-Sepharose Fast Flow (Amersham) を 100 mM HEPES-KOH, pH8.0 で 3 回洗浄した後、抗血清を添加し、室温で 1 時間反応させることで抗体を protein A に結合させた。反応後、100 mM HEPES-KOH, pH8.0 で 3 回洗浄し、500  $\mu$ M PMSF を含む 100 mM HEPES-KOH pH8.0 に懸濁した後、攪拌しながら室温で 15 分間置いた。その後、LFB2/50 で 5 回洗浄することで抗体結合 proteinA-Sepharose を得た。得られた懸濁液から緩衝液を出来る限り除いた後、卵抽出液と混合し、攪拌しながら 4°C で 1 時間インキュベートした。30  $\mu$ m ナイロンメンブレンフィルターを用いて濾過することにより proteinA-Sepharose を除いたものを免疫除去抽出液とした。

1. LFB2/50

40 mM HEPES-KOH pH8.0, 20 mM K-Pi pH8.0, 1 mM EGTA, 2 mM

DTT, 10% sucrose, 50 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 2.5 mM ATP, 1  $\mu$ g/mL

pepstatin A, 1  $\mu$ g/mL leupeptin

#### 4.7 免疫沈降

10  $\mu$ L の卵抽出液を 40  $\mu$ L EB で希釈後、3  $\mu$ L の免疫前血清または抗 xRecQL4 抗血清を

添加し氷上で2時間インキュベートし、10  $\mu$ L proteinA-Sepharose Fast Flow (Amersham) と混合したのち、さらに攪拌しながら4°Cで1時間インキュベートした。インキュベート後、RIPAで8回洗浄し、30  $\mu$ Lの2.5 $\times$ loading buffer for SDS-PAGEと混合後、溶出されたタンパク質を免疫沈降画分とした。

#### 1. RIPA

10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA-NaOH pH 7.4, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, and 1  $\mu$ g/mL pepstatin A

### 4.8 Chromatin-immunoprecipitation (ChIP)

精子核 DNA (5000 nuclei/ $\mu$ L) を e.r., CHX, 0.2 Units/ $\mu$ L の *Eco*RI (Takara) を含む 50  $\mu$ L の卵抽出液と 23°C で 45 分インキュベートした。インキュベート後、1 mL の 1% ホルムアミドを含む TNIB で懸濁し氷上で 10 分インキュベートした。その後、200  $\mu$ L 15% sucrose/TNIB を下層に敷き、10,000 rpm、4°C、5 分間遠心し、クロマチン画分を単離した。単離したクロマチン画分を 1 mL TNIB で洗浄後、クロマチン画分を 300  $\mu$ L TNIB で懸濁し、VP-30s homogenizer (Taitec) で 10 秒間 8 サイクルの超音波処理によりクロマチンを分断した。その後、5,000 rpm、4°C、5 分間遠心し、得られた上清に 3  $\mu$ L の免疫前血清または抗 RecQL4 抗血清を添加したのち、氷上で 2 時間インキュベートした。さらに、20  $\mu$ L proteinA-Sepharose Fast Flow (Amersham) と混合し、攪拌しながら 4°C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、TNIB で 8 回洗浄し、30  $\mu$ L の 2.5 $\times$ loading buffer for SDS-PAGE と混合後、溶出されたタンパク質をサンプルとした。

### 4.9 RecQL4 のリン酸化の検出

精子核 DNA (5,000 nuclei/ $\mu$ L) を e.r., CHX, 0.2 units/ $\mu$ L *Eco*RI (Takara)、1  $\mu$ M geminin、10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を含む 50  $\mu$ L の卵抽出液と 23°C で 60 分インキュベートした。インキュ

ベート後、1 mL RIPA に懸濁し、氷上で5分インキュベートした。反応液を 14,000 rpm、5 分間、4°C で遠心し、得られた上清に 5  $\mu$ L 抗 xRecQL4 抗血清を添加して、氷上で2時間インキュベートした。インキュベート後、20  $\mu$ L proteinA-Sepharose Fast Flow (Amersham) と混合し、攪拌しながら氷上で2時間インキュベートした。proteinA-Sepharose Fast Flow を回収してから RIPA で1回、TNIB で4回洗浄し、30  $\mu$ L の 2.5 $\times$ loading buffer for SDS-PAGE と混合することによりタンパク質を溶出した。溶出されたタンパク質を SDS-PAGE で展開後、PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜を MilliQ で軽く洗浄後、風乾してから imaging plate を2日間露光し、FLA-3000 (Fuji Photofilm) により結果を解析した。

#### 4.10 DNA 複製の再開 (restart assay)

精子核 DNA (180,000 nuclei) を e.r.、CHX、50  $\mu$ g/mL アフィディコリン (SIGMA) を含む 80  $\mu$ L の卵抽出液と 23°C で60分インキュベートした。インキュベート後、1 mL T'NIB に懸濁し、氷上で5分インキュベートした。その後、200  $\mu$ L 15% sucrose/T'NIB を下層に敷き、8,000 rpm、5 分間、4°C の遠心操作によりクロマチン画分を単離した。単離したクロマチン画分を e.r.、CHX、1  $\mu$ M geminin を含む 40  $\mu$ L の卵抽出液に懸濁し、氷上で10分間インキュベートしたのち 4  $\mu$ L を取り、e.r.、CHX、1  $\mu$ M geminin、1.85 kBq/ $\mu$ L の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP を含む 16  $\mu$ L の卵抽出液と混合してから 23°C でインキュベートした。その後、0.2 mg/mL proteinase K を含む stop C solution を加えて反応を停止し、よく混合してから 37°C で30分間以上インキュベートした。インキュベート後、10% TCA solution を加えさらに 4°C で30分間以上置くことで酸不溶性画分を沈降させた。この沈降物を 25 mm GF/C disc (Whatman) を用いて捕集し、5% TCA solution、ethanol で GF/C disc を洗浄後、乾燥させた。乾燥した GF/C disc をイオン交換水に浸し、捕集された放射活性をチェレンコフ法により測定した。

##### 1. T'NIB

50 mM KCl, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 2 mM DTT, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine, 1 µg/mL pepstatin A, 1 µg/mL leupeptin, 0.01% TritonX-100

#### 4.11 $\gamma$ H2AX 法

精子核 DNA (5,000 nuclei/µL) を e.r., CHX, 0.05 units/µL *Eco*RI (Takara) を含む 100 µL の卵抽出液と 23°C で 5 分インキュベートした。インキュベート後、1 mL T'NIB で懸濁し、200 µL 15% sucrose/T'NIB を下層に敷いたのち、8,000 rpm、5 分間、4°C で遠心することによりクロマチン画分を単離した。単離したクロマチン画分を e.r., CHX を含む 50 µL の卵抽出液に懸濁し、1.5 mL のエッペンドルフチューブに分注後、氷上で 10 分間インキュベートした。e.r., CHX を含む 16 µL の卵抽出液を各チューブに添加し、23°C でインキュベートしたのち、4.5 の操作により解析をおこなった。

#### 4.12 Chk1 のリン酸化の検出

免疫除去卵抽出液 100 µL に対して、e.r., CHX, 50 µg/mL アフィディコリン (SIGMA) を添加し、ここに終濃度が 1,000 nuclei/µL となるように精子核 DNA を添加後、23°C で 60 分インキュベートした。インキュベート後、1 mL intact nuclei isolate buffer (INIB) で希釈し、8,000 rpm、5 分間、4°C で遠心して核を含む沈降画分を得た。さらに、1 mL INIB を添加し、再度 8,000 rpm、5 分間、4°C で遠心し、上清を除いた。得られたサンプルを SDS-PAGE で展開したのち、western blot により解析した。

##### 1. INIB

30 % sucrose in EB

#### 4.13 キナーゼ阻害剤を用いた解析



caffeine (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) と wortmannin (Sigma-Aldrich Co.) は、終濃度がそれぞれ 5 mM と 100  $\mu$ M となるように精子核 DNA 未添加の卵抽出液に添加した。希釈は全て EB を用いておこなった。

## 第 5 節 抗原を用いた抗体のアフィニティー精製

免疫に使った 2 mg の RecQL4 抗原を、SDS-PAGE に展開した後、泳動されたタンパク質を PVDF フィルター (HyBond-P) (Amersham) に電氣的に転写した。転写したメンブランをボンソーS 染色液で 20 分染色後、Tween 20/PBS で洗浄した。ボンソーS が脱色された後、2% BSA、0.1 %  $\text{NaN}_3$  in Tween 20/PBS を用いて、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween 20/PBS で 3 回洗浄し、抗原部位のみを細かく裁断してから、Tween 20/PBS と共に、10 mL Poly-prep column (BIO-RAD) に充填した。ここに、500 $\mu$ L の xRecQL4 抗血清を添加し、室温で 2 時間反応させた。10 mL Tween 20/PBS、10 mL Wash buffer  $\times$  2、10 mL Tween 20/PBS、10 mL 150 mM NaCl の順番でメンブランを洗浄したのち、0.1 M glycine-HCl, pH 2.5 で抗体を溶出した。溶出液には溶出量の 1/20 vol. の 1 M Tris-HCl (pH 9.0) を添加し、pH 7.5 に調整した。得られた抗体は、分注して $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 1. ボンソーS 染色液

1% ボンソーS、5% 酢酸

### 2. Tween 20/PBS

137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.04 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.05% Tween 20

### 3. 2% BSA、0.1 % $\text{NaN}_3$ in Tween 20/PBS

137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.04 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.05% Tween 20、2% BSA、1%  $\text{NaN}_3$

### 4. wash buffer

20 mM Tris-HCl pH7.5、1 M NaCl、1% TritonX-100、150 mM NaCl

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野教授 榎本武美先生に謹んでお礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、有益なご助言をいただきました東北大学大学院薬学研究科薬物動態学分野教授 山添康先生、医薬資源化学分野助教授 倉田祥一郎先生に深くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始ご指導ご協力をいただきました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野助教授 関政幸先生、遺伝子薬学分野助手 多田周右先生に厚くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始親切なご指導をいただきました遺伝子薬学分野研究員 津山崇さんに心よりお礼申し上げます。

最後になりましたが、研究のみならず、様々なご助言、ご協力いただきました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野助手 吉村明先生はじめ遺伝子薬学分野のみなさんに心より感謝いたします。

## 参考文献

Asaad, N.A., Zeng, Z.C., Guan, J., Thacker, J. and Iliakis, G. (2000). Homologous recombination as a potential target for caffeine radiosensitization in mammalian cells: reduced caffeine radiosensitization in XRCC2 and XRCC3 mutants. *Oncogene*. *19*, 5788-5800.

Avemann, K., Knippers, R., Koller, T., and Sogo, J. M. (1998). Camptothecin, a specific inhibitor of type I DNA topoisomerase, induces DNA breakage at replication forks. *Mol Cell Biol* *8*, 3026-3034.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S. Y., Taya, Y., Anderson C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, *281*, 1674-1677.

Bezzubova, O. Y., Silbergleit, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Takeda, S. and Buerstedde, J. M. (1997). Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a Rad54 (-/-) mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell*, *89*, 185-193.

Bischof, O., Kim, S. H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N. A., and Campisi, J. (2001). Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol* *153*, 367-380.

Blasina, A., Price, B. D., Turenne, G. A., and McGowan, C. H. (1999). Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr. Biol.*, *9*, 1135-1138.

Blow, J.J., and Laskey, R.A. (1998). A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* *332*, 546-548.

Boulton, S. J. and Jackson, S. P. (1996). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: role in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.*, 24, 4639-4648.

Boulton, S. J. and Jackson, S. P. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serve as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J*, 15, 5093-5103.

Brosh, R. M., Jr., Driscoll, H. C., Dianov, G. L., and Sommers, J. A. (2002). Biochemical characterization of the WRN-FEN-1 functional interaction. *Biochemistry* 41, 12204-122016.

Brosh, R. M., Jr., Karmakar, P., Sommers, J. A., Yang, Q., Wang, X. W., Spillare, E. A., Harris, C. C., and Bohr, V. A. (2001). p53 Modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein. *J Biol Chem* 276, 35093-35102.

Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histon H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.

Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C. and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 19, 1040-1052.

Coleman, T.R., Carpenter, P.B. and Dunphy, W.G. (1996). The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell*. 87, 53-63.

Constantinou, A., Tarsounas, M., Karow, J. K., Brosh, R. M., Bohr, V. A., Hickson, I. D., and West SC. Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. (2000). *EMBO Rep.*, *1*, 80-84.

Cooper, M. P., Machwe, A., Orren, D. K., Brosh, R. M., Ramsden, D., and Bohr, V. A. (2000). Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev.*, *14*, 907-912.

Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brcal in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* *286*, 1162-1166

Costanzo, V., Robertson, K., Ying, C.Y., Kim, E., Avvedimento, E., Gottesman, M., Grieco, D. and Gautier, J. (2000). Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Mol Cell.* *6*, 649-659.

Davies, A. A., Masson, J. Y., McIlwraith, M. J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A. R., and West SC. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell.* *7*, 273-282.

Elia, A. EH., Cantley, L. C., and Yaffe, M. B. (2003). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science*, *299*, 1228-1231.

Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T. Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocci, S., Proytcheva, M., and German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* *83*, 655-666.

Eltsov, M., Grandi, P., and Raska, I. (2000). Ultrastructural characterization of RPA-containing domains in nuclei assembled in *Xenopus* egg extracts. *J Struct Biol* 129, 211-217.

Essers, J., Hendriks, R. W., Swagemakers, S. M. A., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J. and Manaar, R. (1997). Disruption of mouse Rad54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell*, 89, 195-204.

Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410, 842-847.

Fujiwara, Y., Higashikawa, T. and Tatsumi, M. (1997). A retarded rate of DNA replication and normal level of DNA repair in Werner's syndrome fibroblasts in culture. *J. Cell Physiol.* 92, 365-374.

Fukui T, Yamauchi K, Muroya T, Akiyama M, Maki H, Sugino A, Waga S. (2004). Distinct roles of DNA polymerases delta and epsilon at the replication fork in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells.* 9, 179-191.

Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M. N., McGowan, C. H., and Russell, P. (1999). Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol. Biol. Cell*, 10, 833-845.

German, J. (1993). Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* 72, 393-406.

Glover, D. M., Hagan, I. M., and Tavares, A. A. M. (1998). Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.*, 12, 3777-3787.

Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J. D., Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., and Jackson, S. P. (2003). MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 952-956.

Grandi, P., Eltsov, M., Nielsen, I. and Raska, I. (2001). DNA double-strand breaks induce formation of RP-A/Ku foci on in vitro reconstituted *Xenopus* sperm nuclei. *J Cell Sci.* 114, 3345-3357.

Graves, P. R., Yu, L., Schwarz, J. K., Gales, J., Sausville, E. A., O' Connor, P. M., and Piwnicka-Worms, H. (2000). The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J. Biol. Chem.*, 275, 5600-5605.

Gray, M.D., Shen, J.C., Kamath-Loeb, A. S., Blank, A., Sopher, B. L., Martin, G. M., Oshima, J. and Loeb, L. A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat. Genet.* 17, 100-103

Guo ,Z., Kumagai, A., Wang, S. X., and Dunphy, W. G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.*, 14, 2745-2756.

Hand, R., and German, J. (1975). A retarded rate of DNA chain growth in Bloom's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 758-762.

Harber, J. E. (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell*, 95, 583-586.

Hashimoto, M., Rao, S., Tokuno, O., Yamamoto, K., Takata, M., Takeda, S. and Utsumi, H. (2003). DNA-PK: the major target for wortmannin-mediated radiosensitization by the inhibition of DSB repair via NHEJ pathway. *J Radiat Res (Tokyo)*. 44, 151-159.

Huang, S., Li, B., Gray, M. D., Oshima, J., Mian, I. S. and Campisi, J. (1998). The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nat. Genet.* 20, 114-116.

Kastan, M.B. (2001). Cell cycle. Checking two steps. *Nature*, 410, 766-767.

Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J. L., West, S.C. and Hickson, I. D. (2000). The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 6504-6508.

Kang, D., Chen, J., Wong, J., and Fang, G. (2002). The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. *J. Cell Biol.*, 156, 249-259.

Karmakar, P., Piotrowski, J., Brosh, R. M., Jr., Sommers, J. A., Miller, S. P., Cheng, W. H., Snowden, C. M., Ramsden, D. A., and Bohr, V. A. (2002). Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 277, 18291-18302.

Kharbanda, S., Yuan, Z. M., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1998). Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene* 17, 3309-3318.

Kim, S. T., Xu, B., and Kastan, M. B. (2002). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage *Genes Dev.*, 16, 560-570.

Kimura, K., and Hirano, T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* 90, 625-634



Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T. (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* 282, 487-490

Kimura, K., Rybenkov, V. V., Crisona, N. J., Hirano, T., and Cozzarelli, N. R. (1999). 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation. *Cell* 98, 239-248

Kirsh, I. (1994). Clinical hypnosis as a nondeceptive placebo: empirically derived techniques. *Am J Clin Hypn* 37, 95-106.

Kitao, S., Ohsugi, I., Ichikawa, K., Goto, M., Furuichi, Y., and Shimamoto, A. (1998). Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics* 54, 443-452.

Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M., and Furuichi, Y. (1999). Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* 22, 82-84.

Kobayashi, T., Tada, S., Tsuyama, T., Murofushi, H., Seki, M., and Enomoto, T. (2002). Focus-formation of replication protein A, activation of checkpoint system and DNA repair synthesis induced by DNA double-strand breaks in *Xenopus* egg extract. *J Cell Sci* 115, 3159-3169.

Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Masuda T, Nojima H, Takisawa H. (1997). Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in *Xenopus* eggs. *EMBO J* 16, 3320-3331.

Kumagai, A., Guo, Z., Emami, K. H., Wang, S. X., and Dunphy, W. G. (1998). The *Xenopus* Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts. *J Cell Biol* 142, 1559-1569.

Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (2000). Claspin, a novel required for the activation of Chk1 during DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 6, 839-849.

Kurihara, T., Tatsumi, K., Takahashi, H., and Inoue, M. (1987). Sister-chromatid exchanges induced by ultraviolet light in Bloom's syndrome fibroblasts. *Mutat Res* 183, 197-202.

Langland, G., Kordich, J., Creaney, J., Goss, K. H., Lillard-Wetherell, K., Bebenek, K., Kunkel, T. A., and Groden, J. (2001). The Bloom's syndrome protein (BLM) interacts with MLH1 but is not required for DNA mismatch repair. *J Biol Chem* 276, 30031-30035.

Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (2001). Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol. Biol. Cell*, 12, 551-563.

Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (2003). Claspin, aChk1-Regulatory Protein, Monitors DNA Replication on Chromatin Independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell*. 11, 329-340.

Lee, J.W., Yannone, S.M., Chen, D.J., Povirk, L.F., (2003). Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res*. 63, 22-24.

- Li, B., and Comai, L. (2001). Requirements for the nucleolytic processing of DNA ends by the Werner syndrome protein-Ku70/80 complex. *J. Biol. Chem.*, *276*, 9896-9902.
- Li, B., and Comai, L. (2002). Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res.*, *30*, 3653-3661.
- Lim, D. S., Kim, S. T., Xu, B., Maser, R. S., Lin, J., Petrini, J. H. J., and Kastan, M. B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, *404*, 613-617.
- Lindor, N. M., Furuichi, Y., Kitao, S., Shimamoto, A., Arndt, C., and Jalal, S. (2000). Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations: report and clinical and molecular comparisons with Bloom syndrome and Werner syndrome. *Am J Med Genet* *90*, 223-228.
- Lopez-Girona, A., Kanoh, J., and Russell, P. (2001). Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Curr. Biol.*, *11*, 50-54.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Wu, X., and Chen, J. (2003). MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways. *Nature*, *421*, 957-961.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*. *108*, 781-794.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, *288*, 1425-1429.

Maiorano D, Moreau J, Mechali M. (2000). XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature*. 404, 622-625.

Martin, G. M. (1997 ). Cellular aging-postreplicative cells. A review. *Am J Pathol*. 89, 513-530

Maser, R.S., Monsen, K.J., Nelms, B.E., and Petrini, J.H., (1997). hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol*. 17, 6087-6096.

Masui, Y., and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177, 129-145.

Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S. J. (1998a). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, 282, 1893-1897.

Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S. J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 97, 10389-10394.

McGarry, T. J., and Kirschner, M. W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93, 1043-1053.

Melchionna, R., Chen, X. B., Blasina, A., and McGowan, C.H. (2000). Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat. Cell Biol.*, 2, 762-765.

Mimura, S., Masuda, T., Matsui, T., and Takisawa, H. (2000). Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells* 5, 439-452.

Mohaghegh, P., Karow, J. K., Brosh Jr, R. M., Bohr Jr, V. A., and Hickson, I. D. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. (2001). *Nucleic Acids Res.*, 29, 2843-2849.

Monnat, R. J., Jr., Hackmann, A. F., and Chiaverotti, T. A. (1992). Nucleotide sequence analysis of human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene deletions. *Genomics* 13, 777-787.

Moore, S. P., Erdile, L., Kelly, T., and Fishel, R. (1991). The human homologous pairing protein HPP-1 is specifically stimulated by the cognate single-stranded binding protein hRP-A. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 88, 9067-9071.

Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105, 177-186.

Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioassays* 20, 1020-1029

Nelms, B.E., Maser, R.S., MacKay, J.F., Lagally, M.G., Petrini, J.H., (1998). In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 280, 590-592.

Nigg, E. A. (1998). Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *10*, 776-783.

Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. and Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature*. *404*, 625-628.

Osborn, A. J. and Elledge, S. J. (2003). Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev.* *17*, 1755-1767.

Pacek, M. and Walter, J.C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *EMBO J.* *23*, 3667-3676.

Painter, R. B., and Young, B. R. (1980). Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* *77*, 7315-7317.

Paull, T.T., Gellert, M., (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* *13*, 1276-1288.

Pedrazzi, G., Perrera, C., Blaser, H., Kuster, P., Marra, G., Davies, S. L., Ryu, G. H., Freire, R., Hickson, I. D., Jiricny, J., and Stagljar, I. (2001). Direct association of Bloom's syndrome gene product with the human mismatch repair protein MLH1. *Nucleic Acids Res* *29*, 4378-4386.

Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A. R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*. *420*, 287-293.

Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, 277, 1501-1505.

Petkovic, M., Dietschy, T., Freire, R., Jiao, R. and Stagljar, I. (2005). The human Rothmund-Thomson syndrome gene product, RECQL4, localizes to distinct nuclear foci that coincide with proteins involved in the maintenance of genome stability. *J Cell Sci.* 118, 4261-4269.

Pichierri, P., Franchitto, A., Mosesso, P., and Palitti, F. (2000). Werner's syndrome cell lines are hypersensitive to camptothecin-induced chromosomal damage. *Mutat Res* 456, 45-57.

Pichierri, P., Franchitto, A., Mosesso, P., Proietti de Santis, L., Balajee, A. S., and Palitti, F. (2000). Werner's syndrome lymphoblastoid cells are hypersensitive to topoisomerase II inhibitors in the G2 phase of the cell cycle. *Mutat Res* 459, 123-133.

Pines, J. (1995). Cyclins, CDKs and cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 6, 63-72.

Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1, E73-79.

Puranam, K. L., and Blackshear, P. J. (1994). Cloning and characterization of RECQL, a potential human homologue of the Escherichia coli DNA helicase RecQ. *J Biol Chem* 269, 29838-29845.

Rogaku, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. and Bonner, W. M. (1998). DNA double-strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858-5868.

Sakamoto, S., Nishikawa, K., Heo, S. J., Goto, M., Furuichi, Y., and Shimamoto, A. (2001). Werner helicase relocates into nuclear foci in response to DNA damaging agents and co-localizes with RPA and Rad51. *Genes Cells* 6, 421-430.

Saintigny, Y., Makienko, K., Swanson, C., Emond, M.J. and Monnat, Jr. R.J. (2002). Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol. Cell Biol.*, 22, 6971-6978.

Sangrithi MN, Bernal JA, Madine M, Philpott A, Lee J, Dunphy WG, Venkitaraman AR. (2005). Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell*. 121, 887-898.

Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 59, 437543-437582

Salk, D., Au, K., Hoehn, H., and Martin, G. M. (1985). Cytogenetic aspects of Werner syndrome. *Adv Exp Med Biol* 190, 541-546.

Schulz, V. P., Zakian, V. A., Ogburn, C. E., McKay, J., Jarzebowicz, A. A., Edland, S. D. and Martin, G. M. (1996). Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum. Genet.* 97, 750-754.

Scolnick, D. M., and Halazonetis, T. D. (2000). Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*, 406, 430-435.



Sekelsky, J. J., Brodsky, M. H., Rubin, G. M., and Hawley, R. S. (1999). *Drosophila* and human RecQ5 exist in different isoforms generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 27, 3762-3769.

Seki, M., Miyazawa, H., Tada, S., Yanagisawa, J., Yamaoka, T., Hoshino, S., Ozawa, K., Eki, T., Nogami, M., Okumura, K., and et al. (1994). Molecular cloning of cDNA encoding human DNA helicase Q1 which has homology to *Escherichia coli* Rec Q helicase and localization of the gene at chromosome 12p12. *Nucleic Acids Res* 22, 4566-4573.

Seki, M., Nakagawa, T., Seki, T., Kato, G., Tada, S., Takahashi, Y., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Aoki, A., Otsuki, M., Habermann, F. A., Tanabe, H., Ishii, Y., and Enomoto, T. (2006). Bloom Helicase and DNA Topoisomerase III $\alpha$  Are Involved in the Dissolution of Sister Chromatids. *Mol Cell Biol.*, 26, 6299-6306.

Seki, M., Yanagisawa, J., Kohda, T., Sonoyama, T., Ui, M., and Enomoto, T. (1994). Purification of two DNA-dependent adenosinetriphosphatases having DNA helicase activity from HeLa cells and comparison of the properties of the two enzymes. *J Biochem (Tokyo)* 115, 523-531.

Seki, T., Tada, S., Katada, T., and Enomoto, T. (1997). Cloning of a cDNA encoding a novel importin-alpha homologue, Qip1: discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 48-53.

Shen, J., and Loeb, L. A. (2001). Unwinding the molecular basis of the Werner syndrome. *Mech Ageing Dev* 122, 921-944.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev* 9, 1149-1163.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S., and Furuichi, Y. (2000). Human RecQ5beta, a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3alpha and 3beta. *Nucleic Acids Res* 28, 1647-1655.

Shin, D. S., Pellegrini, L., Daniels, D. S., Yelent, B., Craig, L., Bates, D., Yu, D. S., Shivji, M. K., Hitomi, C., Arvai, A. S., Volkmann, N., Tsuruta, H., Blundell, T. L., Venkitaraman, A. R., and Tainer, J. A. (2003). Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO J* 22, 4566-4576.

Shinohara, A., Ogawa, H. and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S.cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*, 69, 457-470.

Siede, W., Friedl, A. A., Dianova, I., Eckardt-Schupp, F. and Friedberg, E. C. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in absence of homologous recombination. *Genetics*, 142, 91-102.

Sillje, H. H. W., and Nigg, E. A. (2003). Signal transduction. Capturing polo kinase. *Science*, 299, 1190-1192.

Smits, V. A. J., Klompmaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E. A., and Medema, R. H. (2000). Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat. Cell Biol.*, 2, 672-676.

Sterner, J.M., Dew-Knight, S., Musahl, C., Kornbluth, S. and Horowitz, J.M. (1998). Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol.* 18, 2748-2757.

Stewart ,G. S., Wang, B., Rignell, C. R., Taylor, A. M. R., and Elledge, S. J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, 421, 961-966.

Tada, S., Chong, J.P., Mahbubani, H.M. and Blow, J.J. (1999). The RLF-B component of the replication licensing system is distinct from Cdc6 and functions after Cdc6 binds to chromatin. *Curr Biol.* 9, 211-214.

Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M., and Blow, J. J. (2001). Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol* 3, 107-113.

Thommes, P. and Blow, J.J. (1997). The DNA replication licensing system. *Cancer Surv.* 29, 75-90.

Tsao, Y. P., Russo, A., Nyamuswa, G., Silber, R., and Liu, L. F. (1993). Interaction between replication forks and topoisomerase I -DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40 DNA replication system. *Cancer Res* 53, 5908-5914.

Trujillo, K.M., Yuan, S.S., Lee, E.Y., Sung, P., 1998. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, p95. *J. Biol. Chem.* 273, 21447-21450.

Unger, T., Juven-Gershon, T., Mollem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., and Haupt, Y. (1999). Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J* 18, 1805-1814.

van Vugt, M. A. T. M., Smits, V. A. J., Klompaker, R., and Medema, R. H. (2001). Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. *J. Biol. Chem.*, 276, 41656-41660.

Waga, S. and Stillman, B. (1998). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex. *Mol Cell Biol.* 18, 4177-4187.

Walter, J., and Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* 5, 617-627.

Wang, H., Guan, J., Wang, H., Perrault, A.R., Wang, Y. and Iliakis, G. (2001). Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxia telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res.* 61, 8554-8563.

Wang, W., Seki, M., Narita, Y., Nakagawa, T., Yoshimura, A., Otsuki, M., Kawabe, Y., Tada, S., Yagi, H., Ishii, Y., and Enomoto, T. (2003). Functional Relation among RecQ Family Helicases RecQL1, RecQL5, and BLM in Cell Growth and Sister Chromatid Exchange Formation. *Mol Cell Biol.* 23, 3527-3535.

Wang, W. S., Seki, M., Yamaoka, T., Seki, T., Tada, S., Katada, T., Fujimoto, H., and Enomoto, T. (1998). Cloning of two isoforms of mouse DNA helicase Q1/RecQL cDNA; alpha form is expressed

ubiquitously and beta form specifically in the testis. *Biochim Biophys Acta* 1443, 198-202.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14, 927-939.

Wang, X. W., Tseng, A., Ellis, N. A., Spillare, E. A., Linke, S. P., Robles, A. I., Seker, H., Yang, Q., Hu, P., Beresten, S., Bemmels, N. A., Garfield, S., and Harris, C. C. (2001). Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis. *J Biol Chem* 276, 32948-32955.

Ward, I. M., and Chen, J. (2001). Histon H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *J Biol Chem*. 276, 47759-47762.

Winston, J.T., Chu, C. and Harper, J.W. (1999). Culprits in the degradation of cyclin E apprehended. *Gene Dev* 13, 2751-2757.

Wohlschlegel, J. A., Dwter, B. T., Dhar, S. K., Cvetic, C., Walter, J. C., and Dutta, A. (2000). Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* 290, 2309-2312.

Wu, L., Davies, S. L., North, P. S., Goulaouic, H., Riou, J. F., Turley, H., Gatter, K. C., and Hickson, I. D. (2000). The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* 275, 9636-9644.

Wu, X., Wilson, T.E. and Lieber, M.R. (1999b). A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining: the order of strand annealing and nucleolytic processing events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

96, 1303-1308.

Xie, S., Wu, H., Wang, Q., Cogswell, P., Husain, I., Conn, C., Stambrook, P., Jhanwar-Uniyal, M., and Dai, W. (2001). Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J. Biol. Chem.*, 276, 43305-43312.

Yanagisawa, J., Seki, M., Ui, M., and Enomoto, T. (1992). Alteration of a DNA-dependent ATPase Activity in Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C Cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 3585-3588.

Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N. H., Zheng, N., Chen, P. L., Lee, W. H., and Pavletich, N. P. (2002a). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*, 297, 1837-1848.

Yannone, S. M., Roy, S., Chan, D. W., Murphy, M. B., Huang, S., Campisi, J., and Chen, D. J. (2001). Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276, 38242-38248.

Yazdi, P. T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, EY-HP., and Qin, J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint *Genes Dev.*, 16, 571-582.

Zhao, H., Watkins, J. L., and Piwnicka-Worms, H. (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14795-14800.

Zhou, B. B. S., Chaturvedi, P., Spring, K., Scott, S. P., Johanson, R. A., Mishra, R., Mattern, M. R.,

Zhou, X. Y., Wang, X., Hu, B., Guan, J., Iliakis, G., and Wang, Y. (2002). An ATM-independent S-Phase Checkpoint Response Involves CHK1 Pathway Cancer Res., 62, 1598-1603.

Zou, L., and Elledge, S. J.. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complex. Science 300, 1542-1548.

熊田裕司 (2004) ロスモンドートムソン症候群原因遺伝子産物 RecQL4 の DNA 傷害時における生化学的挙動の解析 東北大学修士論文

渡辺沙里 (2005) DNA 複製開始制御タンパク質 Cdt1 とその阻害タンパク質 geminin の構造と機能の関係 東北大学修士論文

青木彩子 (2004) Top3 $\alpha$ 、BLM の細胞周期に依存した挙動の解析 東北大学学士論文

董 宇鵬 (2003) RecQL4 の機能に関するアフリカツメガエル卵抽出液を用いた解析 東北大学修士論文